



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ABORDAGEM DA ENDOMETRITE NUM CENTRO DE REPRODUÇÃO EQUINA:
PRESENÇA DE FLUIDO UTERINO COMO PARÂMETRO INDICADOR DA INFLAMAÇÃO

MARIA INÊS BAPTISTA ROMEIRAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

ORIENTADORA

Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

CO-ORIENTADOR

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

2017
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ABORDAGEM DA ENDOMETRITE NUM CENTRO DE REPRODUÇÃO EQUINA:
PRESENÇA DE FLUIDO UTERINO COMO PARÂMETRO INDICADOR DA INFLAMAÇÃO

MARIA INÊS BAPTISTA ROMEIRAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa
Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias
Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

ORIENTADORA

Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

CO-ORIENTADOR

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

2017
LISBOA

DECLARAÇÃO

Nome: _____

Endereço eletrónico: _____ **Telefone:** _____

Número do Bilhete de Identidade: _____

Título: Dissertação

Abordagem da endometrite num centro de reprodução equina: presença de fluido uterino como parâmetro indicador da inflamação

Orientadora:

Doutora Ana Catarina Belejo Mora Torres

Co-Orientador:

Dr. José Carlos Miguéis Nunes Duarte

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado ou do ramo de conhecimento do Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa, _____ de _____ de 2017

Assinatura: _____

À minha família,

Agradecimentos

Quero agradecer a todos aqueles que me acompanharam neste percurso e neste sonho de ser veterinária.

À Professora Doutora Ana Catarina Torres, por orientar a minha dissertação, pela amizade, pelos bons momentos partilhados, por me ajudar e acreditar em mim. Conseguimos!

Ao Dr. José Carlos Duarte, por ter aceite co-orientar a minha tese e me ter recebido na Luso-Pecus, pela transmissão de conhecimentos e vontade em ensinar.

À restante equipa da Luso-Pecus, em especial à Dra. Cristina Cosinha e à Joana Maltez, pela ajuda neste estudo, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança que depositaram em mim, pelo exemplo diário que me deram de esforço e dedicação, por estes 6 meses de ritmo intenso, por me mostrarem que podemos fazer sempre mais e melhor.

Ao Dr. Luís Fragoso, pela amizade e boa disposição, pelos conselhos, incentivos e disponibilidade com que sempre me recebe e ensina, por ser uma referência para mim.

Ao Doutor Nestor Chagas e Silva, pela amizade com que me acompanhou nos últimos anos do curso, por estar sempre disponível para me ensinar e para me ouvir.

Ao Professor Telmo Nunes, pela simpatia e disponibilidade com que me ajudou na análise estatística.

À Joana, a minha companheira de curso e de estágios, pela sua ajuda preciosa nesta dissertação, por estar sempre presente e partir comigo à aventura. Pela alegria contagiante, por ser o meu apoio, por ser a mais presente e melhor amiga que podia ter!

Aos meus amigos e companheiros de curso, em especial à Mendonça e ao Rúben, por serem os melhores, por me acompanharem e aturarem ao longo destes 6 anos, por todos os momentos e gargalhadas partilhadas! À Márcia, Vanessa, Mariana, Tânia e Joanas, por fazerem com que estes anos de curso fossem mais alegres e as épocas de exames menos longas.

Às minhas amigas de sempre, em especial à Luísa e à Mafalda, por estarem sempre comigo, onde quer que esteja. À Bia, Cathy, Inês, Mariana, Miguel e André, por todos os anos de amizade. À minha Gui, a minha madrinha e conselheira e à restante família da equitação.

À minha família, porque são aqueles que me aturam diariamente, que se preocupam e que suportam a minha má disposição, que me apoiam e que me ajudam a ultrapassar os obstáculos. Um obrigado especial à minha mãe, o meu exemplo em tantas coisas, por todo o

opoio e carinho que demonstra todos os dias. Ao meu pai, por ter sempre acreditado nas minhas capacidades e pelo orgulho que exprime. Ao meu primo João, pela sua ajuda e por ser como um irmão. Aos meus avós, porque sei que se orgulhariam de mim.

Ao meu Leão e à minha Marie, pelo amor incondicional.

TÍTULO: Abordagem da endometrite num centro de reprodução equina: presença de fluido uterino como parâmetro indicador de inflamação

RESUMO

A endometrite é uma inflamação aguda ou crónica do endométrio com etiologia multifatorial e constitui um dos principais problemas reprodutivos dos equinos, sendo a maior causa da infertilidade das éguas. Uma vez que a infertilidade está associada a uma perda económica significativa no sector da reprodução equina, revela-se importante o estudo da fisiopatologia e dos fatores que contribuem para o aparecimento da endometrite, pelo que é essencial um correto diagnóstico etiológico e uma caracterização do grau de inflamação, de modo a ser estabelecido o tratamento adequado o mais rapidamente possível. O objetivo do presente trabalho foi o estudo da abordagem das endometrites num centro de reprodução, com o intuito de avaliar a influência de diferentes variáveis no aparecimento de fluido uterino à ecografia e a viabilidade da utilização deste parâmetro como medida indireta do estabelecimento e grau da inflamação uterina. Foram analisados os dados de um centro de reprodução, localizado no Porto Alto, relativos à época reprodutiva de 2017 de uma amostra de 186 éguas, divididas em três grupos: Grupo 1 (n=186) representado pela totalidade das éguas; Grupo 2 (n=34) representado pelas éguas submetidas a lavagem uterina 24 horas após a IA ou cobrição; Grupo 3 (n=10), representado pelas éguas sujeitas a lavagem uterina pré-IA ou cobrição. Nos grupos 2 e 3 foi realizada uma avaliação citológica do grau de inflamação, a partir dos fluidos obtidos através das lavagens uterinas. Recorrendo à análise estatística, foi possível correlacionar as variáveis estudadas, tendo sido utilizado o limiar de $p < 0,05$ para estabelecer as diferenças significativas. Em relação ao grupo 1, foi concluído que as variáveis que influenciaram significativamente a presença de fluido uterino foram: a idade da égua, o tipo de reprodução e a repetição da IA ou salto. Foi ainda verificada uma correlação positiva significativa entre a presença de fluido uterino e o diagnóstico de gestação negativo. No grupo 2, verificou-se a existência de uma relação positiva significativa entre a inflamação uterina e a presença de linfócitos, bem como entre a repetição das lavagens e o diagnóstico de gestação. No grupo 3, apenas a presença de bactérias se mostrou relacionada com a inflamação uterina. Este trabalho permitiu concluir que a presença de fluido uterino à ecografia não constituiu um método infalível de diagnóstico da endometrite, revelando-se importante a realização de outros meios complementares de diagnóstico, como a citologia endometrial.

Palavras-chave: *égua; endometrite; ecografia uterina; fluido uterino; lavagem uterina; citologia endometrial.*

TITLE: Approach endometritis in a equine reproduction center: presence of uterine fluid as an indicator parameter of inflammation

ABSTRACT

Endometritis is an acute or chronic inflammation of the endometrium with a multifactorial etiology and consists in one of the main equine reproductive problems, being the major cause of infertility in the mare. Since infertility is associated with an enormous economic loss in the equine breeding industry, it is important to study the pathophysiology and the factors that contribute to the development of endometritis. A correct etiological diagnosis and a characterization of the degree of inflammation are essential to establish the appropriate treatment as soon as possible. The aim of this study was to investigate the endometritis approach in a reproduction center in order to evaluate the influence of different variables on the appearance of uterine fluid on uterine ultrasonography and the viability of using this parameter as an indirect measure of the establishment and degree of uterine inflammation. A data analysis was performed from a reproduction center located in Porto Alto, during the 2017 breeding season, in a sample of 186 mares, divided into three groups: Group 1 (n = 186) which contained all mares; Group 2 (n = 34) consisting of mares submitted to uterine lavage 24 hours after AI or mating; Group 3 (n = 10), consisting of mares subjected to pre-AI or uterine lavage. In groups 2 and 3 a cytological evaluation of the degree of inflammation was performed, from the uterine fluids collected through the uterine flushings. The statistical analysis allowed to correlate the variables studied, using the threshold of $p < 0.05$ to establish the significant differences. Regarding group 1, the variables that significantly influenced the presence of uterine fluid were: age of mare, type of reproduction and repetition of AI or mating. There was also a significant positive correlation between the presence of fluid and pregnancy rate. In group 2, there was a statistically significant positive relationship between uterine inflammation and the presence of lymphocytes and between the repetition of the uterine lavage and the pregnancy rate. In group 3, only the presence of bacteria was statistically related to uterine inflammation. In conclusion, the presence of uterine fluid on uterine ultrasonography was an unreliable parameter of indirect diagnosis of endometritis. Therefore, it is important to use other diagnosis techniques, such as endometrial cytology.

Keywords: *mare; endometritis; uterine ultrasonography; uterine fluid; uterine lavage; endometrial cytology.*

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas.....	xii
Índice de gráficos.....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xiv
INTRODUÇÃO	1
PARTE I: Relatório de estágio.....	3
1. Atividades realizadas	3
1.1. ADS Baixo Tejo/ Vet Equilíbrio, Lda.....	3
1.2. Luso-Pecus, Lda	4
PARTE II: Revisão bibliográfica.....	8
1. Anatomia e função do útero.....	8
2. Endometrite.....	9
2.1. Fatores predisponentes	10
2.1.1. Fatores relacionados com a égua.....	10
2.1.2. Fatores relacionados com os microrganismos	11
3. Mecanismos de defesa uterina.....	11
3.1. Barreiras físicas	12
3.2. Depuração uterina	12
3.2.1. Contrações uterinas.....	12
3.2.2. Aparelho mucociliar	13
3.2.3. Cérvix	14
3.2.4. Drenagem linfática.....	14
3.3. Mecanismos humorais e celulares	14
4. Fisiopatologia da endometrite.....	15
4.1. Resposta inflamatória	16
4.2. Inflamação uterina fisiológica associada à cobrição.....	19
4.2.1. Ação dos espermatozoides.....	19
4.2.2. Função do plasma seminal	20

4.2.3. Influência do tipo de sémen	20
4.2.4. Influência do local de deposição do sémen e momento da IA.....	21
4.2.5. Influência dos diluidores	23
4.3. Endometrite Bacteriana.....	24
4.4. Endometrite fúngica	24
4.5. Endometrite crónica	25
5. Métodos de diagnóstico da endometrite.....	25
5.1. Exame físico e sinais clínicos.....	25
5.2. Ecografia uterina.....	26
5.3. Endoscopia do trato reprodutivo.....	27
5.4. Técnicas de recolha de amostras endometriais para avaliação citológica, microbiológica e histológica.....	27
5.4.1. Zaragatoa uterina	28
5.4.2. Escova citológica	29
5.4.3. Lavagem uterina	29
5.4.4. Biópsia endometrial	31
5.5. Citologia endometrial	31
5.6. Microbiologia endometrial	33
5.7. Histologia endometrial.....	35
5.8. Biomarcadores da endometrite	35
6. Tratamento da endometrite.....	36
6.1. Ocitócitos	36
6.2. Lavagem uterina	37
6.3. Tratamento antibiótico.....	38
6.4. Agentes mucolíticos e quelantes.....	39
6.5. Imunomoduladores	40
6.6. Tratamento antifúngico	40
PARTE III - Estudo da abordagem da endometrite num centro de reprodução equina.	42
1. Objetivo.....	42
2. Materiais e métodos.....	42
2.1. Amostra	42
2.2. Recolha e processamento do sémen	44

2.3. Controlo reprodutivo: monitorização ecográfica e tratamento da endometrite	44
2.4. Lavagem uterina	46
2.5. Citologia endometrial	47
2.5.1. Coloração Diff-Quik.....	48
2.5.2. Coloração de Gram.....	49
2.5.3. Avaliação citológica	49
2.6. Análise estatística	51
3. Resultados.....	52
3.1. Grupo 1 (Geral).....	52
3.1.1. Caracterização dos parâmetros avaliados	52
3.1.2. Idade.....	52
3.1.3. Tipo de reprodução (IA ou salto)	53
3.1.4. Tipo de sémen	54
3.1.5. Repetição da IA ou salto	54
3.1.6. Presença de fluido uterino	55
3.2. Grupo 2 (Pós-IA ou cobrição)	55
3.2.1. Caracterização dos parâmetros avaliados	56
3.2.2. Presença e quantidade de fluido uterino	56
3.2.3. Presença de bactérias	57
3.2.4. Presença de linfócitos	58
3.2.5. Grau de inflamação.....	59
3.2.6. Repetição das lavagens uterinas	60
3.2.7. Tratamento adicional.....	61
3.3. Grupo 3 (Pré-IA ou cobrição)	61
3.3.1. Caracterização dos parâmetros avaliados	61
3.3.2. Presença e quantidade de fluido uterino	62
3.3.3. Presença de bactérias	62
3.3.4. Presença de linfócitos	64
4. Discussão.....	65
4.1. Grupo 1 (Geral).....	66
4.1.1. Idade.....	66
4.1.2. Tipo de reprodução (IA ou salto)	67

4.1.3. Tipo de sémen	67
4.1.4. Repetição da IA ou salto	69
4.1.5. Presença de fluido uterino.....	69
4.2. Grupo 2 (Pós-IA ou cobrição)	69
4.2.1. Presença e quantidade de fluido uterino	69
4.2.2. Presença de bactérias	71
4.2.3. Presença de linfócitos	72
4.2.4. Grau de inflamação.....	72
4.2.5. Repetição das lavagens uterinas	73
4.2.6. Tratamento adicional.....	74
4.3. Grupo 3 (Pré-IA ou cobrição)	75
4.3.1. Presença e quantidade de fluido uterino	75
4.3.2. Presença de bactérias	76
4.3.3. Presença de linfócitos	77
5. Conclusão	78
PARTE IV: Referências bibliográficas	79

Índice de figuras

Figura 1 - Representação esquemática dos componentes da parede uterina	9
Figura 2 - Esquema da sequência de eventos relacionados com a resposta inflamatória uterina, que ocorrem após a IA ou cobertura	18
Figura 3 - Ecografias transretais em que é possível a visualização e medição da quantidade de fluido uterino presente	46
Figura 4 - Procedimento da lavagem uterina e exemplo de fluidos uterinos recolhidos por meio desta técnica	47
Figura 5 - Procedimento da realização de esfregaços para citologia	48
Figura 6 – Procedimento da realização da Coloração Diff-Quik	49
Figura 7 - Procedimento da realização da coloração De Gram	49
Figura 8 – Fotografias dos esfregaços de fluido uterino previamente corados com coloração De Gram	50
Figura 9 - Avaliação citológica dos esfregaços corados pela coloração Diff-Quik	51

Índice de tabelas

Tabela 1 – Casuística das atividades reprodutivas realizadas: nº de casos observados (n) e frequência relativa (FR) (%)	5
Tabela 2 - Casuística das áreas de intervenção: frequência absoluta (n) e frequência relativa (%)	6
Tabela 3 - Frequência absoluta (n) e frequência relativa (%) das atividades realizadas	7
Tabela 4 – Caracterização dos grupos utilizados no trabalho experimental e das variáveis analisadas em cada grupo	43
Tabela 5 - Classificação do grau de inflamação consoante a percentagem de PMN em relação às células endometriais	50
Tabela 6 - Valores de significância estatística de p value para cada variável analisada	52
Tabela 7 - Frequências absolutas e relativas da presença de fluido uterino à ecografia, em relação ao tipo de reprodução (IA ou cobertura natural)	54
Tabela 8 - Frequências absolutas e relativas da presença de fluido uterino à ecografia, em relação ao tipo de semen utilizado (refrigerado e congelado).....	54
Tabela 9 - Frequências absolutas e relativas da presença de fluido uterino à ecografia, em relação à repetição da IA ou salto	54
Tabela 10 - Frequências absolutas e relativas do diagnóstico de gestação, em relação à presença de fluido uterino à ecografia.....	55
Tabela 11 - Valores de significância estatística de p value para cada variável analisada	55
Tabela 12 - Frequências absolutas e relativas da presença de linfócitos, em relação à presença de bactérias	59
Tabela 13 - Frequências absolutas e relativas do diagnóstico de gestação, em relação à repetição da lavagem uterina nesse ciclo.....	60
Tabela 14 - Frequências absolutas e relativas do diagnóstico de gestação, em relação à realização de tratamento adicional	61
Tabela 15 - Valores de significância estatística de p value para cada variável analisada	61
Tabela 16 - Frequências absolutas e relativas da presença de linfócitos, em relação à presença de bactérias	64

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Gráfico Boxplot comparativo entre as idades das éguas e a presença de fluido intrauterino à ecografia	53
Gráfico 2 - Gráfico Boxplot comparativo entre as idades das éguas e o resultado do diagnóstico de gestação.....	53
Gráfico 3 - Gráfico Boxplot comparativo entre o fluido uterino medido em cm e a presença de inflamação uterina.....	57
Gráfico 4 - Gráfico Boxplot comparativo entre o fluido uterino medido em cm e a presença de bactérias	58
Gráfico 5 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de bactérias	58
Gráfico 6 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de linfócitos.....	59
Gráfico 7 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e o resultado do diagnóstico de gestação.....	60
Gráfico 8 - Gráfico Boxplot comparativo entre fluido uterino medido em cm e a presença de inflamação uterina.....	62
Gráfico 9 - Gráfico Boxplot comparativo entre fluido uterino medido em cm e a presença de bactérias	63
Gráfico 10 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de bactérias	63
Gráfico 11 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de linfócitos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

IA	Inseminação artificial
FR	Frequência relativa
<	Menor
>	Maior
=	Igual
%	Porcentagem
n	Número de casos
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
cm	Centímetro
mL	Mililitro
ADS	Agrupamento de Defesa Sanitária
Lda	Limitada
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofina
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
PMN	Polimorfonuclear neutrófilos
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
C3	Componente 3 do complemento
PGE2	Prostaglandina E
PGF2α	Prostaglandina F2 α
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NET	Redes extracelulares de neutrófilos
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
IL	Interleucinas
IL1β	Interleucina 1 β

IL-6	Interleucina 6
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
MHz	Megahertz
LR	Lactato de Ringer
L	Litro
Ref	Referência
HPF	Campos de alta potência
TSA	Teste de sensibilidade aos antibióticos
UI	Unidades Internacionais
IV	Intravenosa
IM	Intramuscular
PGE1	Prostaglandina E1
NAC	N-acetilcisteína
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Força g

INTRODUÇÃO

Existe uma enorme perda económica e genética no sector da reprodução equina relacionada com os problemas de fertilidade que algumas éguas apresentam. A endometrite é a maior causa de subfertilidade e infertilidade nas éguas e a terceira patologia mais comum dos equinos, podendo causar várias complicações ao alterar o ambiente uterino, nomeadamente a incapacidade de ficar gestante, morte embrionária, aborto, placentite, septicémia neonatal e metrite pós-parto. Este processo patológico constitui assim um dos maiores problemas reprodutivos que os Médicos Veterinários têm de enfrentar (Hurtgen, 2006; Leblanc & Causey, 2009).

A endometrite é uma inflamação aguda ou crónica do endométrio com etiologia multifatorial, podendo ser causada por uma infeção (bacteriana, fúngica ou viral) ou ocorrer após a inseminação artificial (IA) ou cobrição. Quando associada à cobrição, trata-se de uma resposta fisiológica normal e necessária para a remoção dos espermatozoides e eventuais contaminantes introduzidos no útero. Algumas éguas não conseguem resolver esta inflamação e a endometrite persiste para além das 48 horas pós-IA (Troedsson, 2006).

O diagnóstico da endometrite representa um desafio pois os sinais clínicos podem ser subtis e, apesar de esta inflamação ser normalmente caracterizada pela presença de fluido uterino à ecografia transretal, este pode não estar associado a um processo inflamatório. É, por isso, essencial, identificar os fatores predisponentes e recorrer a meios complementares de diagnóstico. Um diagnóstico etiológico correto bem como a caracterização do grau e tipo de inflamação são de extrema importância, de modo a estabelecer o tratamento adequado o mais rapidamente possível, dado que os tratamentos disponíveis são múltiplos e variados e o protocolo terapêutico deve ser específico para cada caso (Cadario, 2014; Maischberger, Irwin, Carrington & Duggan, 2008).

Assim, revela-se importante explorar este tema de forma a aprofundar o conhecimento da comunidade veterinária e fornecer as ferramentas necessárias para o diagnóstico e tratamento das endometrites, diminuindo, consequentemente, o impacto económico das mesmas.

A vontade de realizar este estudo surgiu após a observação diária, num centro de reprodução, da importância que as endometrites assumem e da percepção do seu impacto na fertilidade, dado o número elevado de éguas em que se verificou a presença de fluido uterino à ecografia e que foram submetidas a lavagem uterina. O presente trabalho teve assim como objetivo o estudo da abordagem das endometrites num centro de reprodução, com o intuito de avaliar a influência de diferentes variáveis no aparecimento de fluido uterino à ecografia e a viabilidade da utilização deste parâmetro como medida indireta do estabelecimento e grau da inflamação uterina. De acordo com o objetivo delineado, foi realizada uma análise dos dados relativos à época reprodutiva de 2017 de um centro de reprodução e foi utilizada a técnica de lavagem

uterina como meio de recolha do fluido uterino para posterior avaliação citológica do grau de inflamação.

Nesta dissertação é apresentada uma revisão bibliográfica relacionada com o tema que compreende uma abordagem geral sobre as endometrites equinas, incluindo a etiologia e os fatores que predispõem ao seu aparecimento, os mecanismos de defesa uterina e fisiopatologia da inflamação do útero e os métodos de diagnóstico e tratamento das endometrites. Relativamente ao trabalho experimental realizado, são descritos os materiais e métodos utilizados e, posteriormente, são apresentados os resultados e a sua discussão, seguindo-se as considerações finais sobre o tema.

PARTE I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. ATIVIDADES REALIZADAS

O sexto ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi dividido em dois períodos de estágio. O primeiro, de âmbito extracurricular, foi realizado no ADS do Baixo Tejo e na Vet Equilíbrio, Lda., sob a orientação do Dr. Luís Fragoso. O Segundo estágio, curricular, foi realizado na Luso-Pecus, Lda., sob a orientação do Dr. José Carlos Duarte. Seguidamente vão ser apresentadas as atividades efetuadas em cada um dos locais, descrevendo mais pormenorizadamente o estágio curricular, que deu origem a esta dissertação.

1.1. ADS Baixo Tejo/ Vet Equilíbrio, Lda.

Este estágio teve uma duração de 4 meses, entre Setembro e Dezembro de 2016, perfazendo um total de aproximadamente 600 horas. Durante este período acompanhei a atividade do Dr. Luís Fragoso no ADS do Baixo Tejo, onde desempenha as funções de Coordenador e Executor do mesmo e na Vet Equilíbrio, Lda., empresa de prestação de serviços veterinários, onde foi possível participar em diversos casos relacionados com a clínica, cirurgia e reprodução de espécies pecuárias e equinos.

O ADS do Baixo Tejo tem como zona de influência explorações de grandes e pequenos ruminantes localizadas sobretudo no concelho de Benavente e freguesias de Vila Franca de Xira, Vila Nova da Rainha e Azambuja. Com a prerrogativa entretanto concedida aos produtores de ruminantes de poderem escolher o ADS que pretendam dentro da mesma Direção Regional, o ADS do Baixo Tejo expandiu o controlo sobre explorações na Arruda dos Vinhos, Chamusca, Coruche, Salvaterra de Magos, Cartaxo e Santarém. Durante o estágio participei ativamente na rotina diária da Brigada Sanitária nº1, cujas atividades se enquadram no cumprimento do Plano Sanitário Anual do ADS e englobam programas de vigilância, profilaxia e identificação animal e a execução do Plano Nacional de Saúde Animal, que engloba os diferentes Planos de Erradicação de Tuberculose Bovina, Brucelose de grandes e pequenos ruminantes e Leucose Enzoótica Bovina. Devo referir que detetámos, durante uma ação de sanidade a um efetivo ovino de uma exploração no concelho de Benavente, um foco de língua azul do serotipo 1, que originou o alargamento da área de vacinação obrigatória ao efetivo ovino reprodutor adulto e aos jovens destinados à reprodução.

Os serviços veterinários prestados pela Vet Equilíbrio, Lda. decorreram maioritariamente na mesma área geográfica anteriormente descrita, embora se alarguem para outras zonas nacionais, nomeadamente para o Alentejo. Durante este estágio foi possível a observação e participação em diferentes áreas, nomeadamente na clínica de espécies pecuárias e equinos, onde se destacam alguns casos como a resolução de prolapsos uterinos, retenções placentárias, intoxicação por taninos e tratamento de feridas. Participei nalgumas cirurgias, como cesarianas, orquiectomias e correções cirúrgicas de feridas de natureza traumática. É

ainda de realçar o trabalho de controlo reprodutivo, que engloba o acompanhamento reprodutivo das vacadas duas a três vezes por ano, através do diagnóstico de gestação por ecografia transretal, análise dos resultados desse controlo e criação de estratégias de melhoramento reprodutivo.

Posso concluir que este foi um estágio muito desafiante e importante na minha formação como médica veterinária, não só pelo grande número de casos observados e pela experiência prática adquirida, como pela possibilidade de discussão da etiologia, diagnósticos diferenciais, terapêutica e prognósticos dos diversos casos encontrados e ainda pela necessidade constante de atualização de conhecimentos.

1.2. Luso-Pecus, Lda.

O estágio curricular que deu origem a esta dissertação foi realizado na Luso-Pecus, Lda., empresa de prestação de serviços veterinários, sediada no Porto Alto, sob a orientação do Dr. José Carlos Duarte. Este estágio decorreu durante seis meses, entre Janeiro e Julho de 2017, completando um total de 1200 horas. Durante este período acompanhei o trabalho do Dr. José Carlos Duarte e da Dra. Cristina Cosinha, que incluiu as atividades de clínica veterinária ambulatoria e as atividades clínicas diárias no Centro de Recolha e Congelação de Sêmen Equino, sediado na Companhia das Lezírias, Porto Alto. Este foi o primeiro a ser desenvolvido em Portugal e está registado na União Europeia com o número PT3E01CS.

O trabalho desenvolvido durante o período de estágio incidiu sobretudo na área da Reprodução Equina, tendo sido efetuado um controlo reprodutivo a 193 éguas. Este foi realizado principalmente no Centro de Recolha e Congelação de Sêmen Equino e também nas explorações dos clientes, onde assisti e participei nas várias atividades desenvolvidas, nomeadamente:

- Recolha de sêmen equino, com recurso a vagina artificial e através da utilização de um manequim fixo, da égua residente no centro ou com o cavalo em estação;
- Processamento de sêmen para refrigeração ou congelação, para utilização por parte da Luso-Pecus, Lda. e envio de doses inseminantes para outros centros de reprodução localizados em Portugal e no estrangeiro (Europa e Estados Unidos da América);
- Acompanhamento reprodutivo das éguas, baseado na avaliação da fase reprodutiva das mesmas, através do exame do trato reprodutivo por palpação e ecografia transretal. Foram observadas as características do útero, nomeadamente a presença de edema das pregas endometriais (classificado numa escala de 0 a IV, de menor para maior edema, respetivamente) e a presença de fluido intrauterino. Foi também realizado um controlo folicular, relativamente ao tamanho, forma, localização dos folículos, consistência/tensão da parede folicular, ecogenicidade do folículo e dor à palpação folicular, com o intuito de previsão do momento de ovulação;

- Execução da terapêutica adequada para cada caso: indução da ovulação (com gonadotrofina coriônica equina - hCG ou com um análogo da hormona libertadora de gonadotrofina - GnRH) das éguas que apresentavam à ecografia um folículo com diâmetro maior ou igual a 35 mm e edema uterino grau III; tratamento de endometrite (administração de ocitocina, lavagem uterina e colocação de antibiótico intrauterino) e tratamento hormonal (prostanglandina, progestagénios).

- Identificação e tratamento de afeções do aparelho reprodutor da égua e do garanhão. Foram realizadas análises de controlo de doenças nos garanhões (6 no total) para a aprovação do seu internamento no Centro, nomeadamente através da recolha de sangue e de zaragatoas do prepúcio, fossa ureteral e sémen, para despiste de *Taylorella equigenitalis* (Metríte Contagiosa Equina), Arterite Viral Equina e Anemia Infeciosa.

As atividades relacionadas com o controlo reprodutivo realizadas durante o período do estágio, que se encontram resumidas na tabela 1, incluíram ainda IA com sémen refrigerado e congelado, diagnósticos de gestação por ecografia transretal aos 15 dias após IA, recolha de embriões para transferência (lavagem uterina no dia 8 após IA), sem resultados positivos e ainda o esmagamento de vesículas embrionárias.

Tabela 1 – Casuística das atividades reprodutivas realizadas: nº de casos observados (n) e frequência relativa (FR) (%)

Atividade realizada	Nº casos observados (n)	FR (%)
Inseminação artificial	263	22,75%
Diagnóstico de gestação	297	25,69%
Recolha de sémen	353	30,53%
Congelação de sémen	86	7,44%
Recolha de embriões	7	0,61%
Lavagens uterinas	141	12,20%
Esmagamento vesículas embrionárias	9	0,78%
TOTAL	1156	100%

Para além do trabalho desenvolvido no Centro, tive ainda oportunidade de acompanhar a atividade de clínica ambulatoria. A área geográfica abrangida pelos serviços veterinários prestados pela Luso-Pecus, Lda. é bastante vasta, centrando-se sobretudo na região do Ribatejo (principalmente no concelho de Benavente) e incluindo, em menor escala, a região de Évora, Alcáçovas, Montemor, Pegões, Vendas Novas, Canha, Moita, Sintra, Azeitão, Costa da Caparica, Bucelas, Tomar e Golegã.

Para além das atividades do foro reprodutivo descritas anteriormente, foi também possível acompanhar e participar nas áreas da identificação equina (resenho, colocação de microchip,

recolha de sangue para genótipo e ferração com azoto fluido), profilaxia (vacinação e desparasitação), cirurgia (orquiectomias, em decúbito e em estação e extração de sarcoides) e clínica, onde se inclui o diagnóstico e tratamento de várias patologias, nomeadamente do aparelho músculo-esquelético (exames de ato de compra, claudicações, exames complementares de diagnóstico com recurso a radiografia e ecografia, bloqueios anestésicos perineurais e infiltrações articulares), aparelho digestivo (correção da mesa dentária, extração de dentes de lobo, cólicas, diarreias e obstrução esofágica), hematologia (piroplasmose), oftalmologia (conjuntivites), dermatologia (dermatite estival, fotossensibilidade primária, nódulos cutâneos e melanomas), aparelho reprodutor (quisto folicular, tumor uterino, lacerações vulvares, vaginais, cervicais e retais, parto distócico de um asinino, retenção placentária, rutura do tendão pré-púbico, parafimose e realização de uma vulvoplastia de Caslick), neonatologia (contraturas e laxidão de tendões, diarreia, anemia e administração de colostro) e traumatologia (tratamento de feridas). Acompanhei ainda atividades que se enquadram noutras áreas de intervenção, nomeadamente assisti a casos de reação ao dipropionato de imidocarb (Imizol®), intoxicação por amitraz (Tactic®), hepatopatias, cálculos renais, morte por traumatismo craniano, síncope e eutanásia. Estas atividades encontram-se sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2 - Casuística das áreas de intervenção: frequência absoluta (n) e frequência relativa (%)

Área de Intervenção	Nº casos observados (n)	FR (%)
Aparelho reprodutor	21	7,95%
Neonatologia	10	3,79%
Aparelho digestivo	33	12,5%
Aparelho músculo-esquelético	31	11,74%
Dermatologia	19	7,20%
Hematologia	9	3,41%
Oftalmologia	2	0,76%
Traumatologia/ feridas	11	4,17%
Cirurgia	8	3,03%
Identificação	50	18,94%
Profilaxia	63	23,86%
Aparelho respiratório	0	0%
Outros	7	2,65%
TOTAL	264	100%

Na tabela 3 está representada a frequência absoluta e relativa das várias atividades realizadas durante o estágio, sendo notória a discrepância entre as intervenções realizadas na vertente da reprodução equina e as restantes.

Tabela 3 - Frequência absoluta (n) e frequência relativa (%) das atividades realizadas

Área de Intervenção	Nº casos observados (n)	FR (%)
Controlo reprodutivo	1156	81,40%
Patologia clínica	151	10,63%
Identificação	50	3,52%
Profilaxia	63	4,44%
TOTAL	1420	100 %

Este estágio foi muito enriquecedor, tanto a nível profissional como pessoal. Sendo a casuística elevada, tive a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos teóricos e práticos no que toca à reprodução e clínica equina e de assistir e participar no trabalho desenvolvido, discutindo os diagnósticos diferenciais, estabelecendo planos de diagnóstico, terapêutica e prognóstico. Foi-me dada a oportunidade de participar ativamente nas diversas tarefas, nomeadamente nas recolhas de sémen, palpação e ecografia transretal, administração de fármacos, recolhas de sangue, tratamentos de feridas, entre outros. Foram 6 meses de aprendizagem constante num local com um ritmo intenso, em que pude experienciar um contacto mais próximo com o mundo profissional.

PARTE II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ANATOMIA E FUNÇÃO DO ÚTERO

O sistema reprodutivo das éguas é constituído pelos ovários, ovidutos, útero, vagina e genitália externa (vestíbulo e vulva) (Koning & Liebich, 2009). O útero é composto por dois cornos uterinos, o corpo do útero e o cérvix (colo do útero). A égua possui um corpo do útero longo, cilíndrico, achatado dorsoventralmente e que se estende cranialmente na cavidade pélvica e abdominal caudal. A sua posição pode ser alterada pela distensão da bexiga ou do intestino (Bergfelt, 2009; England, 2005). Os cornos uterinos encontram-se localizados na cavidade abdominal e são normalmente simétricos, perdendo a simetria durante a gestação (England, 2005; Sertich, 2007). Estão separados por um septo curto na sua bifurcação e terminam no óstio uterino do oviduto, que se abre numa pequena papila na extremidade de cada corno uterino, que serve de válvula, prevenindo o refluxo do conteúdo do útero para o óstio uterino, formando assim uma barreira contra infeções ascendentes (Koning & Liebich, 2009). O cérvix consiste num esfíncter que controla o acesso ao útero e é formado por pregas longitudinais. Possui um óstio uterino interno para o corpo do útero e um óstio uterino externo para a vagina, que se projeta no lúmen vaginal formando um portio vaginalis proeminente (Koning & Liebich, 2009; Sinowatz, 2012).

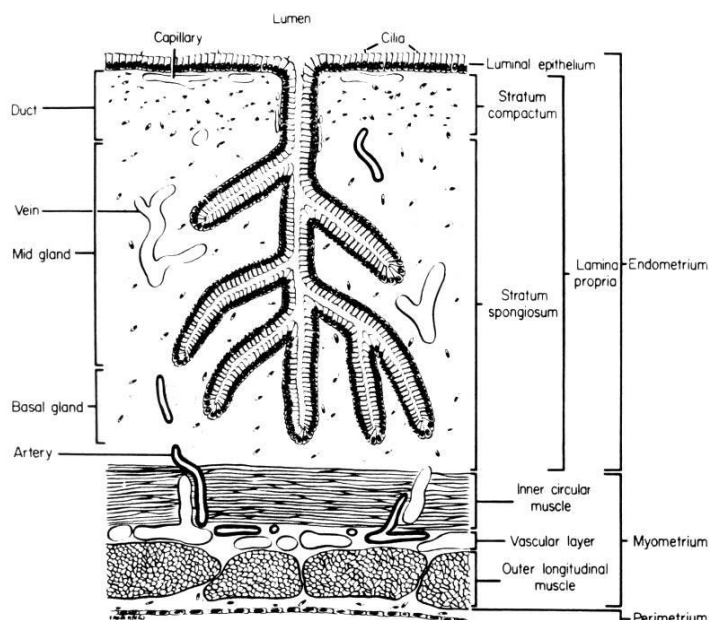
O útero encontra-se ligado à região lombar e suspenso na cavidade pélvica e abdominal caudal pelo ligamento largo, que é dividido em três: o mesométrio (suporta o útero), a mesossalpinge (suporta o oviduto) e o mesovário (suporta o ovário). O útero é irrigado por três artérias (ramo uterino da artéria vaginal, artéria uterina e ramo uterino da artéria ovárica) e veias correspondentes. O fluido intersticial é drenado do útero através dos vasos linfáticos e das glândulas linfáticas para o ducto torácico. Contudo, o útero não recebe qualquer inervação sensorial (Koning & Liebich, 2009; Sertich, 2007).

A parede uterina é constituída por três camadas: uma camada serosa externa contígua com o ligamento largo, o perimétrio; uma camada central muscular, o miométrio; e uma membrana interior mucosa, o endométrio (Koning & Liebich, 2009; Sertich, 2007). O miométrio consiste numa camada muscular espessa, composta por uma camada externa de fibras musculares longitudinais, uma camada central vascular (o estrato vascular) e uma camada interna de fibras musculares circulares (Koning & Liebich, 2009). O endométrio apresenta-se sob a forma de pregas orientadas longitudinalmente e que se estendem através do corpo uterino e do cérvix. É constituído por duas partes, o epitélio luminal e a lâmina própria, que se estende desde a membrana basal do epitélio até ao miométrio. O epitélio luminal varia com as fases do ciclo éstrico e pode ir desde cúbico a cilíndrico e algumas das células podem ser ciliadas. A lâmina própria é constituída por duas camadas: o estrato compacto, a seguir ao epitélio luminal, que é caracterizado por uma densidade de células do estroma relativamente elevada; e o estrato esponjoso, que possui uma densidade celular mais baixa. Na lâmina própria

existem numerosas glândulas uterinas, que estão ligadas à superfície luminal por ductos (Kenney, 1978; Koning & Liebich, 2009; Sertich, 2007). A diferenciação do endométrio normal está dependente de alterações endócrinas cíclicas e sazonais, que resultam numa modificação da morfologia das células epiteliais e do estroma, dependendo da fase do ciclo éstrico (Hoffmann et al., 2009).

O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fertilização do oócito que ocorre no oviduto. Um ambiente uterino adequado é fundamental para a sobrevivência do embrião quando ele atinge o útero, aos 5 a 6 dias após a ovulação. O endométrio é responsável pela nutrição do embrião através da secreção de histotrofo pelas glândulas endometriais, assegurando o desenvolvimento do embrião. Adicionalmente, participa na formação das taças endometriais, estruturas temporárias produtoras de gonadotrofina coriônica equina (eCG), bem como na implantação e desenvolvimento da placenta (Pycock, 2007a; Sertich, 2007).

Figura 1 - Representação esquemática dos componentes da parede uterina (adaptado de Ginther, 1991)



2. ENDOMETRITE

A endometrite trata-se de uma inflamação do endométrio e pode ser classificada segundo a sua etiologia e fisiopatologia em aguda, crônica, ativa, subclínica, pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, associada à cobrição ou persistente (Hurtgen, 2006). Antigamente pensava-se que a endometrite era exclusivamente de origem bacteriana. No entanto, estudos recentes indicam que o mais correto é diferenciar entre endometrites causadas por infecção uterina e uma inflamação fisiológica associada à cobrição, resultante da exposição uterina ao sêmen. Em ambas as situações há uma reação inflamatória por parte do útero que se caracteriza por acumulação de fluido intrauterino (Troedsson & Woodward, 2016).

Para uniformizar o estudo das endometrites, as éguas são divididas em dois grupos: as suscetíveis e as resistentes. As éguas suscetíveis são aquelas que têm propensão para

desenvolver endometrite persistente, especialmente devido à dificuldade na eliminação de produtos da inflamação e detritos, após o parto ou cobertura. As éguas resistentes são aquelas que não têm tendência para desenvolver uma infecção uterina pois conseguem executar uma rápida e eficaz depuração do útero (Leblanc & Causey, 2009).

A endometrite é a maior causa de infertilidade nas éguas, podendo causar vários problemas, incluindo incapacidade de ficar gestante e morte embrionária (Leblanc & Causey, 2009). Os sinais clínicos das endometrites são muito variáveis, sendo estas por vezes difíceis de diagnosticar. Deste modo, é importante identificar os fatores predisponentes, relacionados com a égua e com os microrganismos.

2.1. Fatores predisponentes

Existem vários fatores relacionados com a égua e com os microrganismos que podem contribuir para a patogénese da endometrite (Leblanc & Causey, 2009).

2.1.1. Fatores relacionados com a égua

Os fatores relacionados com a égua prendem-se principalmente com a idade, conformação perineal, depuração uterina e competência cervical (Leblanc & Causey, 2009). A idade e o número de partos estão associados a uma resposta imunitária sistémica alterada (Asbury, Halliwell, Foster & Longino, 1980; Mitchell, Liu, Perryman, Stabenfeldt & Hughes, 1982), sendo que com o avançar da idade vai ocorrendo uma menor proliferação linfocitária, associada a um aumento da produção de citocinas inflamatórias (Adams, Breathnach, Katepalli, Kohler & Horohov, 2008).

Os fatores de risco relacionados com alterações anatómicas podem ser causados pela idade, partos e cobrições frequentes e incluem defeitos dos órgãos reprodutores internos e externos, como por exemplo má conformação vulvar, esfíncter vagino-vestibular incompetente, alongamento vaginal, cérvix incompetente ou patologias genitais, como pneumovagina ou lacerações vaginais e cervicais, que podem facilitar a entrada de agentes patogénicos (LeBlanc, 2008; Pycock, 2009). Num estudo realizado por Christoffersen et al. (2015), concluiu-se que a endometrite causada por *Streptococcus zooepidemicus* está associada com a idade avançada, número de partos e má conformação vulvar.

A idade, os partos e as cobrições frequentes podem também causar alterações degenerativas, como modificações no miométrio, fibrose periglandular, degenerescência vascular, linfangiectasia, cicatrizes, atrofia das pregas endometriais e defeitos no aparelho mucociliar que podem originar transtornos na drenagem uterina de bactérias, fluido e detritos (LeBlanc, 2008; Pycock, 2009; Woodward, Christoffersen, Campos, Squires & Troedsson, 2012).

As éguas com fibrose cervical, que possuem um cérvix estreito e alongado, atrofia das pregas endometriais, um útero pendular ou outras alterações prejudiciais do trato reprodutivo que possam provocar um atraso na depuração uterina, têm tendência a acumular fluido

intrauterino (LeBlanc, Johnson, Calderwood-Mays & Valderrama, 1995; LeBlanc, Neuwirth, Jones, Cage & Mauragis, 1998; Pycck, 2009). Esta acumulação compromete as defesas uterinas, o que contribui para a diminuição da fertilidade (Causey, 2007; Ferreira-Dias, Nequin & King, 1994).

A gravidade das lesões vasculares aumenta com a idade e número de partos. Segundo Liu, Esteller-Vico, Couto, Hirschbrunner e Aly (2008), as éguas mais velhas (idade superior a 15 anos) e múltiparas têm maior probabilidade de apresentar uma degenerescência vascular moderada a grave do que éguas mais novas e nulíparas. Nas éguas suscetíveis que apresentam degenerescência vascular, que pode incluir elastose, fibrose, fibroelastose da parede vascular, fibrose perivascular e processos de calcificação, o fluxo sanguíneo uterino e a perfusão tecidual estão diminuídos (Esteller-Vico, Liu, Steffey, Vaughan & Brosnan, 2007; Ferreira, Gastal & Ginther, 2008). É necessário um suporte sanguíneo eficaz para que haja quantidades adequadas de neurotransmissores, hormonas e substâncias inflamatórias nos tecidos do endométrio. A degenerescência vascular provoca distúrbios na drenagem uterina, reduzindo o retorno venoso nos seios capilares (Leblanc & Causey, 2009). Se a drenagem for reduzida ou a inflamação persistir, há desenvolvimento de um edema endometrial patológico, caracterizado pela linfangiectasia persistente e que resulta num prolongamento da resposta inflamatória e diminuição da fertilidade (Leblanc & Causey, 2009; Samper, 2009).

2.1.2. Fatores relacionados com os microrganismos

A alteração dos mecanismos de defesa uterina pode ser atribuída a fatores relacionados com os microrganismos que se prendem com a indução da inflamação, aderência epitelial, resistência à fagocitose e viscosidade das secreções (Causey, 2006). Algumas bactérias podem alterar as propriedades do muco, aumentando ou diminuindo a sua viscosidade, tornando os cílios incapazes de expelir os exsudados uterinos. Estas mudanças na produção, viscosidade e elasticidade do muco e da função ciliar afetam negativamente a depuração uterina e podem interferir com a penetração dos antibióticos intrauterinos, levando a falhas terapêuticas ou resistência antibiótica (Leblanc & Causey, 2009).

3. MECANISMOS DE DEFESA UTERINA

A defesa uterina é um processo complexo que tem como finalidade proteger o útero da égua dos contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional. As defesas uterinas estão aumentadas durante o estro, período de dominância do estrogénio. Devido ao efeito desta hormona, o cérvix encontra-se aberto e existem contrações expulsivas do miométrio e maior atividade fagocitária. Por esta razão, as manipulações uterinas invasivas devem ser conduzidas preferencialmente durante esta fase do ciclo éstrico. Durante o diestro, a concentração de progesterona é maior, havendo uma menor capacidade de resolução da infeção devido ao efeito imunossupressor desta hormona. No entanto, ocorre

menor contaminação do útero durante esta fase pois o cérvix encontra-se fechado, o muco cervical mais espesso, não existe recetividade sexual e há menor risco de contaminação iatrogénica (Brito & Barth, 2003; Causey, 2007).

3.1. Barreiras físicas

A vulva, o esfíncter vagino-vestibular e o cérvix representam as barreiras físicas do trato reprodutivo da égua e constituem a primeira linha de defesa contra a infeção uterina. Um comprometimento destas barreiras expõe a égua a agentes contaminantes e irritantes, como fezes, ar e bactérias (Canisso, Stewart & Coutinho da Silva, 2016; Causey, 2007).

Os lábios vulvares devem estar perfeitamente coaptados e a vulva orientada verticalmente com 2/3 do comprimento vulvar localizado abaixo da extremidade pélvica, sendo a sua conformação avaliada pelo índice de Caslick (Caslick, 1937). Esta orientação providencia uma barreira eficaz contra as fezes e ar. O esfíncter vagino-vestibular trata-se da única barreira física que permanece funcional durante o estro, dado que a vulva e o cérvix se encontram relaxados, e que auxilia na prevenção da entrada de ar e detritos para a porção cranial da vagina. O cérvix não deve apresentar lacerações nem aderências e deve-se encontrar relaxado e aberto durante o estro e fechado durante o diestro e gestação (Canisso et al., 2016; Causey, 2007).

Estas barreiras físicas são ultrapassadas durante a cobrição, IA ou procedimentos intrauterinos, sendo que nestes casos o útero fica dependente dos outros mecanismos de defesa para se proteger dos contaminantes (Causey, 2007).

3.2. Depuração uterina

O fator mais importante na defesa do útero contra a infeção é a depuração rápida dos detritos inflamatórios após o parto ou a cobrição. Algumas éguas apresentam defeitos anatómicos ou degenerativos que dificultam a limpeza do útero, como a perda de suporte estrutural do trato reprodutivo, presença de fibrose, redução do aporte sanguíneo para o miométrio, diminuição da drenagem linfática e disfunção contráctil (Leblanc & Causey, 2009; Troedsson, 1999).

3.2.1. Contrações uterinas

É provável que a origem da endometrite induzida pela cobrição e das endometrites infeciosas esteja relacionada com falhas nos mecanismos físicos de depuração uterina devido a alterações nas contrações do útero. De facto, defeitos na contractibilidade do miométrio podem ser responsáveis pelo atraso na depuração uterina, uma vez que as contrações miométricas são fulcrais para uma remoção física eficiente de fluídos e detritos do útero (Troedsson, 1999). A contractibilidade do miométrio é mediada por hormonas (ocitocina e Prostaglandina $F_{2\alpha}$ - $PGF_{2\alpha}$) e neurotransmissores, libertados após cobrição ou inflamação (Brito & Barth, 2003). Contudo, pode existir um defeito intrínseco na contractibilidade das

células do miométrio, que resulta numa inabilidade de gerar tensão suficiente quando estimuladas pela ocitocina (Rigby et al., 2001).

Em condições experimentais, após a inoculação de bactérias no útero, a atividade mioelétrica uterina (frequência e intensidade das contrações do miométrio) aumentou imediatamente e manteve-se elevada durante 20 horas, nas éguas resistentes. Nas éguas susceptíveis isso não aconteceu, indicando um relaxamento do miométrio (Troedsson, Liu, Ing, Pascoe & Thurmond, 1993). Noutro estudo realizado por Leblanc et al. (1994), foi utilizado radiocoloide para estudar o atraso na depuração uterina e foi observado que as éguas suscetíveis retinham mais radiocoloide, 2 horas após a sua infusão no útero, do que as éguas resistentes. Com estas investigações foi confirmado que defeitos na contractibilidade do miométrio podem ter uma contribuição importante na patologia da endometrite persistente.

Durante a inflamação uterina, pode haver acumulação intrauterina de óxido nítrico (NO), produzido em excesso pela óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). O NO é um mediador inflamatório que induz relaxamento do músculo liso, podendo causar uma diminuição da contractibilidade uterina, comprometendo assim a função do miométrio (Alghamdi, Foster, Carlson & Troedsson, 2005; Khan et al., 2017; Khan, Scholtz & Chenier, 2015; Woodward et al., 2013). Durante um estudo realizado *in vitro*, foi observado que o tecido endometrial não conseguiu responder aos estímulos elétricos na presença de NO (Liu, Rakestraw, Coit, Harmon & Snyder, 1997). Nas éguas suscetíveis, a iNOS acumula-se no fluido uterino, encontrando-se numa concentração superior no fluido recolhido 13 horas após a cobrição em comparação com as éguas resistentes, o que se confirma pelo aumento da expressão endometrial de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) da iNOS após a inseminação, nas éguas suscetíveis (Alghamdi et al., 2005; Khan et al., 2015; Woodward et al., 2013).

3.2.2. Aparelho mucociliar

O muco desempenha um papel importante na proteção e limpeza das superfícies mucosas do trato reprodutivo. O endométrio contém cílios e é coberto por uma camada de muco (Causey et al., 2000). Alterações patológicas do endométrio resultam, inevitavelmente, em alterações estruturais da superfície epitelial como a perda de células ciliadas e da integridade da barreira mucosa, providenciando locais para a adesão das bactérias (Causey, 2006; Lu & Morresey, 2006). O epitélio mucociliar contém adaptações que facilitam o transporte do muco, como as pregas do epitélio e o deslizar das secreções por caminhos bem definidos. As pregas endometriais aumentam a área de epitélio sobreposto, o que aumenta as correntes ciliares. O útero das éguas parece, portanto, adaptado ao fluxo das secreções mucosas (Causey, 2007). A combinação das contrações uterinas e a propulsão da camada de muco pelos cílios pode prevenir a adesão das bactérias ao endométrio e expulsar as bactérias e as células inflamatórias do útero, através do cérvix (Leblanc & Causey, 2009).

O muco, para cumprir a sua função de depuração uterina, deve consistir numa camada contínua, com elasticidade e viscosidade adequadas. Uma alteração da sua hidratação pode alterar esta viscosidade e elasticidade, interrompendo a continuidade da camada de muco (Leblanc & Causey, 2009). Durante o ciclo éstrico ocorrem modificações fisiológicas do muco, sendo que a sua quantidade aumenta durante o estro, mas as secreções tornam-se mais densas durante o diestro (Causey et al., 2000).

Uma produção excessiva de muco está relacionada com falhas na concepção. Durante a endometrite aguda, há um aumento da sua produção e da altura das células epiteliais. Nas endometrites crónicas pode ocorrer perda do epitélio, alteração da arquitetura do lúmen, perda da camada de muco e aumento de oportunidade para a adesão das bactérias. Estas mudanças podem contribuir para a persistência da infeção uterina (Causey et al., 2008).

3.2.3. Cérvix

Durante o estro o cérvix contribui para a depuração uterina, através de algumas mudanças como o relaxamento cervical, aumento do edema e das pregas cervicais. O relaxamento cervical causa um alargamento do lúmen do cérvix, permitindo uma expulsão mais eficaz do sémen e fluido inflamatório. O cérvix apresenta muitos cílios, o que aumenta a superfície do epitélio, contribuindo assim para o aumento do aparelho mucociliar (Causey, 2007). O muco cervical tem como função manter o ambiente uterino estéril e defender o útero contra os microrganismos, agindo simultaneamente como barreira física e microfiltro. Contém também imunoglobulinas, especialmente a IgA, e proteínas com atividade antimicrobiana (Lu & Morresey, 2006).

3.2.4. Drenagem linfática

Após o encerramento do cérvix, os vasos linfáticos uterinos removem as células inflamatórias e as partículas que se encontram no lúmen uterino e drenam o edema (LeBlanc et al., 1995). Quando as pressões intraluminais são baixas, a drenagem linfática não é eficiente, permitindo a entrada de fluido no lúmen uterino em vez da sua ascensão pelos vasos linfáticos (Causey, 2006). LeBlanc et al (1995) concluíram que as éguas suscetíveis apresentavam uma diminuição da drenagem linfática em relação às éguas resistentes.

3.3. Mecanismos humorais e celulares

O contacto do sémen e das bactérias com o útero induz uma série de reações e mecanismos tanto celulares como humorais. Em ambas as situações ocorre uma rápida resposta inflamatória, caracterizada pela expressão de citocinas pro e anti-inflamatórias e um influxo de polimorfonuclear neutrófilos (PMN) para o útero, que constituem a primeira linha de defesa imunitária contra as bactérias invasoras (Troedsson & Woodward, 2016).

O útero possui tecido linfoide associado à mucosa, que produz e secreta imunoglobulinas (Ig). Alguns estudos mostraram que ocorre difusão passiva de Ig da circulação periférica para o lúmen uterino e que a IgG e a IgA são produzidas localmente pelo trato genital, sendo esta última predominante (Widders, CR, David & Bourne, 1985; Widders et al., 1984). Estudos imunohistoquímicos do endométrio sugeriram que as concentrações de Ig livres mantêm-se num nível constante durante todo o ciclo éstrico (Waelchli & Winder, 1987). Waelchli e Winder (1991) concluíram que a eficiência da resposta uterina não depende unicamente da imunidade humoral.

Este órgão encontra-se sujeito a mudanças cíclicas que afetam sobretudo o endométrio e a população de leucócitos residentes (Schuberth et al., 2008). Foi demonstrada a existência de uma população residente de PMN no endométrio, em éguas saudáveis, durante a fase inicial do estro e 24 a 96 horas após a ovulação (Card, 2005). De facto, durante o estro podem ser encontrados PMN no endométrio, à superfície e dentro dos vasos. No entanto, os PMN presentes no tecido estão relacionados com inflamação. Pode também ser observado um pequeno número de linfócitos dispersos no endométrio normal, estando o seu aumento relacionado com a ocorrência de um processo inflamatório crónico. Os macrófagos e os plasmócitos são também indicadores de inflamação crónica e a presença destes últimos pode estar relacionada com a produção de Ig específicas (Snider, Sepoy & Holyoak, 2011). Os eosinófilos são indicadores de alguns processos inflamatórios característicos, como infeções fúngicas ou pneumovagina (Kenney, 1978; Kenney & Doig, 1986).

4. FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRITE

Existem vários estudos em que são discutidos os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na endometrite persistente e a sua correlação com a endometrite bacteriana e infertilidade. O endométrio responde à introdução de ar, urina, sémen, bactérias, fungos ou leveduras através de uma reação inflamatória. Existem diversos estudos em que são induzidas endometrites sob condições experimentais, através da infusão uterina de espermatozoides ou bactérias, como o *S. zooepidemicus* ou *Escherichia coli*. As éguas suscetíveis não conseguem resolver a endometrite e desenvolvem uma inflamação persistente, que afeta a fertilidade (Pasolini, Prete, Fabbri & Auletta, 2016). Adicionalmente, se a égua não consegue remover as bactérias do útero que podem ter sido introduzidas durante a cobrição, pode desenvolver-se uma infeção bacteriana (Madsen & Christensen, 1995; Ricketts & Mackintosh, 1987).

A dificuldade na remoção física dos detritos inflamatórios do útero após o parto ou a cobrição pode desencadear inflamação uterina. Os mecanismos da depuração uterina, fisiopatologia, sinais clínicos e terapia diferem um pouco consoante se trata de uma endometrite induzida pela cobrição ou de uma endometrite infecciosa (Pasolini et al., 2016).

4.1. Resposta inflamatória

A reação do útero ao sémen e bactérias pode envolver mecanismos humorais e celulares, com diferenças nas éguas suscetíveis e resistentes. Investigadores descobriram que uma inoculação assética de espermatozoides no útero causou uma resposta inflamatória semelhante à desenvolvida após inoculação intrauterina de bactérias (Kotilainen, Huhtinen & Katila, 1994; Troedsson, Steiger, Ibrahim, Foster & Crabo, 1995).

A maioria dos autores concorda que as Ig estão envolvidas principalmente nas respostas do endométrio à presença de bactérias (Asbury et al., 1980). Após a infusão uterina de bactérias, foi observado um declínio nos níveis uterinos de IgG e C3 nas primeiras 24 horas, o que indica uma resposta uterina e opsonização das secreções uterinas (Troedsson et al., 1993a). No entanto, os investigadores não detetaram diferenças entre as éguas suscetíveis e as éguas resistentes e por isso concluíram que apesar do sistema imune adquirido desempenhar um papel na endometrite, não é provável que a suscetibilidade à endometrite persistente seja causada por um defeito neste mecanismo (Asbury et al., 1980; Mitchell et al., 1982; Williamson, Dunning, O'Connor & Penhale, 1983).

Após a introdução de espermatozoides e bactérias no útero, há ativação da cascata do complemento que leva à formação de leucotrieno B₄, Prostaglandina E₂ e PGF_{2α} e outros metabolitos do ácido araquidónico, que induzem o aumento da permeabilidade vascular e o influxo de proteínas séricas e de PMN para o lúmen uterino dentro de 30 minutos. Os PMN atingem um pico máximo entre as 6 e as 12 horas após inoculação (Katila, 1996; Pycock & Allen, 1988; Watson, Stokes & Bourne, 1987b; Watson, Stokes & Bourne, 1987a; Williamson, Munyua, Martin & Penhale, 1987). Estes têm uma função de limpeza uterina, destruindo os microrganismos patogénicos de duas maneiras. O mecanismo primário é a fagocitose, sendo que o processo de opsonização tem um papel central neste mecanismo de defesa uterina. As bactérias sofrem opsonização, principalmente pelas proteínas do complemento e pelas IgG, sendo posteriormente fagocitadas pelos PMN (Brito & Barth, 2003; Troedsson, Liu & Thurmond, 1993b). O segundo mecanismo está relacionado com a capacidade dos PMN de libertarem o seu ácido desoxirribonucleico (ADN) em resposta a estímulos infecciosos e de formarem redes extracelulares de neutrófilos (NET). As NET consistem em grandes complexos de moléculas de ADN e histonas com ação antimicrobiana, que aprisionam e eliminam as bactérias no local da infeção (Alghamdi & Foster, 2005; Amulic & Hayes, 2011; Brinkmann, 2004; Lögters et al., 2009; Rebordão et al., 2014). No entanto, as NET podem induzir a libertação de moléculas nocivas para o endométrio, contribuindo para a lesão dos tecidos inflamados (Lögters et al., 2009).

Foi observado que, aparentemente, a manipulação transretal do útero e do cérvix pode ser suficiente para induzir um aumento transitório dos PMN no útero (Williamson et al., 1987).

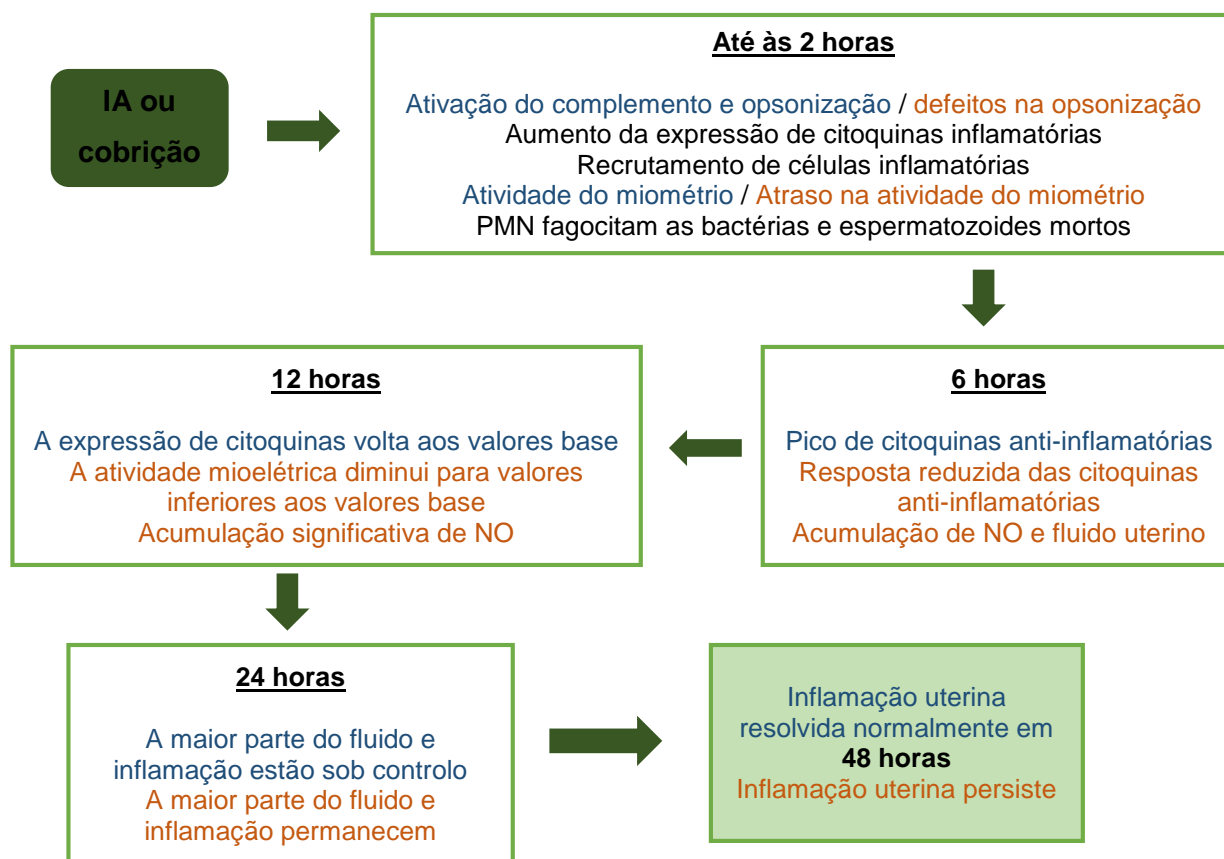
Durante a ativação dos PMN, a PGF_{2α} é libertada pelas membranas celulares através do metabolismo do ácido araquidónico pela via da cicloxigenase. A PGF_{2α}, para além de ser um

mediador da inflamação, estimula as contrações do miométrio, que em combinação com a propulsão ciliar da camada de muco, promove a eliminação das bactérias e células inflamatórias mortas através do cérvix (Troedsson, 1999; Troedsson, 2006a).

O fluido intrauterino inflamatório é composto por PMN, mediadores inflamatórios e proteínas plasmáticas, incluindo imunoglobulinas e enzimas (Pycock & Allen, 1990; Watson et al., 1987a; Watson et al., 1987b). O fluido uterino inativa as proteínas do complemento, necessárias à fagocitose dos PMN e separa as pregas endometriais, o que dificulta a depuração mucociliar. Adicionalmente, retira uma superfície na qual os PMN podem fagocitar as bactérias, providenciando assim um fraco ambiente para a fagocitose (Troedsson, 1999). Estudos iniciais supuseram que as éguas suscetíveis tinham PMN uterinos defeituosos, com uma capacidade de fagocitar diminuída, em comparação com os PMN das éguas resistentes (Cheung, Liu, Walsh & Mille, 1985; Watson et al., 1987a). No entanto, outros investigadores observaram que os PMN do útero das éguas suscetíveis são funcionais no ambiente certo, mas concluíram que as secreções uterinas das éguas suscetíveis têm uma capacidade de opsonização intrauterina comprometida (Troedsson, Liu & Thurmond, 1993).

Nas éguas resistentes as bactérias são eliminadas até 12 horas após inoculação e a maior parte do fluido uterino é eliminado em 6 a 12 horas, verificando-se que às 24 horas pós-IA ou cobrição a maioria parte dos produtos inflamatórios já foram removidos do útero e o ambiente uterino deve estar recuperado (Pycock & Newcombe, 1996; Troedsson, 1997; Woodward & Troedsson, 2013). Pelo contrário, as éguas suscetíveis não conseguem resolver a inflamação fisiológica associada à cobrição e mantêm uma inflamação persistente, verificando-se acumulação de fluido intrauterino e edema endometrial durante mais de 3 a 5 dias pós-IA. A taxa de gestação fica comprometida pelo ambiente uterino inadequado e eventual desenvolvimento de infeção bacteriana (LeBlanc, Asbury & Lyle, 1989). Para além disso, a libertação da PGF2 α resulta na luteólise, com consequente declínio de progesterona e retorno precoce ao estro (Pycock, 2007).

Figura 2 - Esquema da sequência de eventos relacionados com a resposta inflamatória uterina, que ocorrem após a IA ou cobrição (adaptado de Woodward & Troedsson, 2013)



Legenda: O texto a azul refere-se às éguas resistentes; o texto a laranja refere-se às éguas suscetíveis e o texto a preto refere-se aos acontecimentos comuns às duas

A resposta inflamatória na endometrite é um processo complexo que envolve múltiplas vias de sinalização. Os linfócitos, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e as células do estroma produzem citocinas que iniciam o reconhecimento do antígeno e recrutamento de células inflamatórias (Parham, 2005; Woodward et al., 2013). A resposta inflamatória é modulada por um equilíbrio entre as expressões de interleucinas (IL) pro e anti-inflamatórias. As citocinas pro-inflamatórias IL1 α e IL1 β são libertadas no início da inflamação e levam ao aumento da transcrição de outras citocinas pro-inflamatórias, que por sua vez levam à ativação e recrutamento de células inflamatórias. Uma importante citocina pro-inflamatória é o interferão- γ (IFN), que tem propriedades antimicrobianas e que promove a migração das células inflamatórias através da parede dos vasos. Adicionalmente, a sua libertação leva ao aumento da iNOS, que desempenha um papel importante na fisiopatologia da endometrite persistente (Alghamdi et al., 2005; Schroder, Hertzog, Ravasi & Hume, 2004; Woodward et al., 2013). Outro mediador potente da resposta inflamatória é o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que regula a expressão de outras citocinas e mediadores inflamatórios e estimula a produção de PGF2 α (Christoffersen et al., 2012; Marey et al., 2016; Pinto-Bravo et al., 2017).

Existem diferenças na expressão das citocinas pro e anti-inflamatórias nas éguas suscetíveis e resistentes. Foi concluído que o tempo crítico para o desenvolvimento da endometrite persistente é às 6 horas pós-IA, pois não foram encontradas diferenças entre as éguas suscetíveis e as resistentes no que toca à inflamação uterina entre as 3 e as 6 horas pós-IA. (Woodward et al., 2013). No entanto, os tempos de resposta inflamatória divergem entre os estudos, consoante o agente agressor (bactérias gram-negativas e sémen), dado que bactérias podem continuar a multiplicar-se no útero, prolongando os sinais iniciais da inflamação. Estes estudos sugerem que o desenvolvimento da endometrite persistente ocorre antes do tempo considerado anteriormente (Troedsson & Woodward, 2016).

4.2. Inflamação uterina fisiológica associada à cobrição

É normal existir uma inflamação uterina transitória em resposta à cobrição ou IA, idêntica à verificada para as bactérias e em que ocorre uma reação inflamatória superior às 6 horas pós-IA que sofre um declínio considerável às 24 horas, resolvendo-se em 48 horas nas éguas resistentes (Figura 2) (Fiala, Pimentel, Mattos, Gregory & Mattos, 2007; Katila, 1996).

Trata-se de uma reação inflamatória cuja finalidade é a remoção do excesso de espermatozoides, plasma seminal e contaminantes do útero antes da chegada do embrião, aproximadamente 5,5 dias após a ovulação (Leblanc & Causey, 2009; Troedsson & Liu, 1991). Esta resposta é limitada a uma reação inflamatória local, não tendo sido detetadas alterações hematológicas nos parâmetros inflamatórios (Tuppits, Orro, Einarsson, Kask & Kavak, 2014). O sémen e os diluidores têm um papel importante na indução dos mecanismos de defesa do útero, dependendo dos componentes seminais, concentração de espermatozoides, viabilidade dos mesmos, local de deposição do sémen e momento da IA (Pasolini et al., 2016).

4.2.1. Ação dos espermatozoides

Os espermatozoides desempenham um papel importante na regulação da inflamação associada à cobrição. Embora isoladamente não possuam ação quimiotática, induzem a quimiotaxia através da sua ligação às células endometriais e PMN, ocorrendo ativação do complemento (Schuberth et al., 2008). Este papel quimiotático dos espermatozoides confirma o carácter fisiológico da inflamação transitória associada à cobrição, necessária para a remoção uterina do excesso de espermatozoides e plasma seminal (Troedsson, Loset, Alghamdi, Dahms & Crabo, 2001).

Foi demonstrado que os espermatozoides vivos e mortos induzem a mesma resposta inflamatória (Katila, 1997). No entanto, apenas espermatozoides com a membrana intacta conseguem interagir com PMN, sendo este contato mediado por proteínas membranares (Taylor, Rath, Zerbe & Schuberth, 2008; Troedsson et al., 1995).

Meia hora pós-IA podem ser encontrados PMN no lúmen uterino, mas o transporte do sémen não está concluído até 3 a 4 horas depois (Katila, 1995). Se as éguas forem cobertas duas

vezes em 24 horas, o sémen da segunda IA vai ser introduzido num ambiente inflamatório, ocorrendo uma ligação entre os espermatozoides e PMN, que resulta na formação de grandes agregados celulares que podem diminuir a sua motilidade, interferindo com o seu transporte para o oviduto (Alghamdi, Foster & Troedsson, 2004; Alghamdi, Troedsson, Laschkewitsch & Xue, 2001). Os espermatozoides mortos, danificados ou imóveis são removidos do útero por fagocitose, sendo a maior parte do sémen eliminado em 4 horas (Katila, 1995; Katila, Sankari & Mäkelä, 2000).

4.2.2. Função do plasma seminal

O plasma seminal consiste na porção líquida do ejaculado e possui um efeito supressivo na ativação do complemento, na quimiotaxia de PMN e na fagocitose (Pycock, 2007). Funciona como um modelador e inibidor da inflamação uterina, o que contribui para a natureza transitória da endometrite induzida pela cópula. Foi constatada uma duração mais curta da endometrite quando o plasma seminal estava incluído na dose inseminante (Troedsson, Loiset, Alghamdi, Dahms & Crabo, 2001). Num estudo realizado por Alghamdi, Foster e Troedsson (2004) foi observada uma diminuição da fertilidade nas éguas que apresentavam endometrite e que foram inseminadas sem a adição de plasma seminal.

O plasma seminal desempenha uma função importante no que toca à depuração uterina, pois possui agentes ocitócitos (ocitocina e prostaglandinas) e contribui para o transporte seletivo do sémen e eliminação dos espermatozoides mortos do útero, pois inibe a ligação entre os PMN e os espermatozoides viáveis mas não a inibe em relação aos espermatozoides não viáveis e bactérias (Pycock, 2007; Troedsson et al., 2005).

Foi identificada uma proteína específica no plasma seminal, a CRISP-3, que aparenta ter a função de proteger seletivamente os espermatozoides viáveis da ligação com os PMN e da fagocitose, *in vitro* (Doty et al., 2011; Troedsson, Desvouses, Hansen & Buhi, 2006). Assim, esta proteína aumenta a sobrevivência dos espermatozoides viáveis num ambiente uterino hostil e assegura que um número suficiente de espermatozoides atinge o oviduto. Foi sugerido que a lactoferrina purificada do plasma seminal reproduz estes efeitos, aumentando a interação celular entre os PMN e os espermatozoides, facilitando a eliminação dos espermatozoides mortos do útero (Troedsson et al., 2014). Estudos recentes concluíram que a lactoferrina modula a resposta inflamatória através da diminuição da expressão das citocinas pro-inflamatórias, estando relacionada com a diminuição do fluido intrauterino e do crescimento bacteriano (Coutinho da Silva, Darr, Moraes & Forshey, 2017).

4.2.3. Influência do tipo de sémen

A concentração espermática e o volume inseminante desempenham importantes papéis na intensidade da resposta inflamatória uterina (Cazales, Hauret, Cavestany & Mattos, 2016; Fiala et al., 2007).

O sémen pode ser utilizado fresco, refrigerado ou congelado. O volume inseminante de sémen fresco e refrigerado varia normalmente entre 5 e 50 mL e a sua dose inseminante deve ser superior a 300×10^6 espermatozoides com movimentos progressivos e retilíneos. Na IA com sémen congelado são utilizadas maiores concentrações espermáticas, em baixos volumes finais, variando normalmente entre 0,5 e 10 mL, sendo que a dose inseminante deve ser superior a 200×10^6 espermatozoides com movimentos progressivos e retilíneos (Matthews & Morris, 2007; Pickett, Squires & McKinnon, 1987).

No estudo realizado por Fiala et al. (2007), os autores concluíram que uma maior concentração espermática constitui um estímulo quimiotático maior, através da ativação do complemento e de outros mediadores inflamatórios, ocorrendo uma fagocitose mais rápida e eficiente dos espermatozoides e bactérias, o que resulta num encurtamento do processo inflamatório. Assim, a utilização de uma dose inseminante com uma concentração maior causa uma resposta inflamatória mais rápida e intensa. Concluíram ainda que o transporte de sémen até às 4 horas pós-IA não é influenciado pela concentração espermática. Estes resultados são concordantes com o estudo realizado por Nikolakopoulos e Watson (2000), em que observaram que quanto menor a agressão para o endométrio, maior o grau de inflamação residual 48 horas depois. Foi ainda concluído que baixas concentrações espermáticas em grandes volumes inseminantes também podem contribuir para uma fertilidade reduzida. Outro problema da IA com volumes elevados é a expulsão de quantidades consideráveis de fluido e sémen para a vagina, imediatamente após a IA (Jones, 1995; Katila, 2001; Rowley, Squires & Pickett, 1990). Quando são utilizados volumes inseminantes pequenos é mais provável que os espermatozoides estejam em contacto com o endométrio durante um maior período de tempo, o que leva a um influxo superior de PMN para o lúmen uterino devido às suas propriedades quimiotáticas (Watson et al., 2001).

Alguns estudos demonstraram que a IA de éguas com a mesma dose de sémen congelado, em diferentes volumes, tiveram efeitos insignificantes na contractibilidade, reação inflamatória e eliminação do sémen (Katila, 2001; Sinnemaa et al., 2005). Pelo contrário, o estudo realizado por Campbell e England (2006) revelou que tanto a infusão de pequenos (10 mL) como de grandes volumes (150 mL) reduz as contrações uterinas. Esta diferença pode dever-se à ausência de estimulação dos recetores de tensão uterinos e à distensão excessiva que leva a uma refratariedade dos recetores, respetivamente. Confirmaram ainda que inseminações com 80 mL aumentam o número, amplitude e duração das contrações uterinas, o que é consistente com estudos anteriores. Tal discrepância entre estudos pode ser devida à utilização de diferentes protocolos e variação dos tempos de recolha de amostras.

4.2.4. Influência do local de deposição do sémen e momento da IA

O sémen fresco ou refrigerado é depositado no corpo do útero (IA convencional), enquanto que para o sémen congelado é realizada uma IA intra-cornual profunda, na qual este é

colocado no corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, perto da papila da junção útero-tubárica, através de orientação transretal do cateter de inseminação. Ainda não é evidente qual destas duas técnicas de IA, convencional ou intra-cornual-profunda, causa maior reação inflamatória por parte do endométrio (Cazales et al., 2016). Antigamente pensava-se que a IA intra-cornual profunda provocava uma endometrite mais grave. No entanto, Lindsey, Bruemmer e Squires (2001), sugeriram o uso da IA intra-cornual profunda como meio para diminuir a inflamação uterina pós-cobrição. Num estudo realizado por Güvenc, Reilas e Katila (2005) foi concluído que a técnica de IA intra-cornual profunda com baixas doses inseminantes não parece irritar a mucosa ou aumentar a inflamação, não aumentando o risco de endometrite pós-IA. Sugeriram ainda que é preferível a utilização de uma dose inseminante reduzida quando se realiza a IA intra-cornual profunda. No entanto, Cazales et al. (2016) observaram que a IA no corpo do útero causou uma maior reação inflamatória do que a IA no corno uterino, independentemente do volume e dose utilizados. Concluíram assim que o local de inseminação pode afetar a reação inflamatória uterina.

Após 8 a 30 minutos da IA, surgem contrações uterinas fortes e repetidas capazes de conduzir os espermatozoides em várias direções (Katila et al., 2000). Por esta razão, alguns espermatozoides originalmente posicionados no corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório podem ser desviados para o outro corno uterino (Morris, Tiplady & Allen, 2003). Esta redistribuição é mais provável quando são utilizadas doses e volumes inseminantes elevados. Por isso, nestes casos, e tendo em conta as taxas de gestação e o grau da inflamação uterina, o local de IA não constitui um fator crítico (Güvenc et al., 2005).

Sieme, Bonk, Hamann, Klug e Katila (2004) não detetaram diferenças nas taxas de gestação entre as várias técnicas de IA. No entanto, segundo Squires, Reger, Maclellan e Bruemmer (2002), a IA no corno uterino resulta numa menor taxa de gestação. Isto pode indicar que a deposição de uma dose elevada no corno uterino pode ser prejudicial (Katila, 2005).

Watson et al. (2001) concluíram que o momento da IA, pré ou pós-ovulatória, não afeta a incidência de fluido intrauterino 12 horas depois. As concentrações séricas de estrogénio e progesterona na altura da IA não influenciaram a depuração uterina e a taxa de gestação, embora as duas hormonas estivessem aumentadas nas IA pré e pós-ovulatórias. A progesterona está associada à diminuição das defesas e depuração do útero e aumenta poucas horas após a ovulação e, por isso, seria de esperar que uma IA pós-ovulatória pudesse predispor à acumulação de fluido intrauterino. Neste estudo foi concluído que não há evidência de que isso aconteça. Pelo contrário, Samper (1995) referiu que uma única IA pré-ovulatória resultava em taxas de gestação superiores do que a IA pós-ovulatória, devido ao envelhecimento dos oócitos entre as 6 e 12 horas pós-IA.

4.2.5. Influência dos diluidores

Existem vários diluidores comerciais que podem ser utilizados, para sémen refrigerado e congelado, sendo que a maior parte inclui leite, derivados de leite ou gema de ovo na sua composição principal (Pugliesi et al., 2012). O INRA96 foi o primeiro diluidor de composição definida, criado por Batellier, Magistrini, Fauquant e Palmer (1997), tendo sido obtidos excelentes resultados com a sua utilização. Os diluidores têm um papel importante na preservação e sobrevivência do sémen, protegendo-o das condições hostis do ambiente uterino e na prevenção do crescimento de microrganismos, diminuindo a contaminação bacteriana através da adição de antibióticos à sua composição (Pickett & Amann, 1987).

O sémen contém uma microflora natural que, em condições normais, não representa um risco de infecção para as éguas. No entanto, pode haver desenvolvimento de infecção uterina nas éguas suscetíveis (Morel, 1999). Estas éguas beneficiam com a adição de antibióticos ao sémen, de modo a controlar o crescimento da microflora do mesmo. Os antibióticos mais comumente utilizados são a polimixina B, a estreptomicina, a amicacina, a ticarcilina, a penicilina e a gentamicina, sendo estes dois últimos os mais utilizados na Europa (Brinsko, Blanchard, Schumacher, Varner & Love, 2011). O crescimento bacteriano é mínimo quando o sémen é recolhido nas melhores condições e refrigerado a 5°C em anaerobiose. Nestes casos, o uso de antibióticos não é necessário para manter a qualidade do sémen. (Aurich & Spengler, 2007; Price, Aurich, Davies-Morel & Aurich, 2008). Adicionalmente, a utilização de grandes quantidades de antibióticos nos diluidores pode prejudicar os parâmetros seminais (Vieira et al., 2002). A adição de lactoferrina aos diluidores pode também ter um efeito benéfico na fertilidade das éguas suscetíveis e diminuir a necessidade de tratamentos adicionais, dado que esta modula a resposta inflamatória e possui atividade bactericida e bacteriostática (Coutinho da Silva et al., 2017)

Os diluidores também desempenham um papel na mediação da inflamação. Foi verificado que a infusão intrauterina de diluidor induz uma resposta, sendo observado que 12 horas depois ocorre um aumento da expressão de ARNm da IL-1 β , IL-6, TNF α e COX-2 no endométrio (Nash, Sheldon, Herath & Lane, 2010; Palm et al., 2008; Troedsson et al., 2001). Os diluidores constituem um estímulo quimiotático maior ou menor, dependendo da sua composição. Palm, Walter, Budik e Aurich (2006), verificaram que a infusão intrauterina de diluidor de gema de ovo provocou um menor influxo de PMN para as camadas superficiais do endométrio do que o diluidor à base de leite, o qual constituiu um estímulo mais irritante para o endométrio. Estes resultados foram posteriormente confirmados por Palm et al. (2008), que sugeriram que a reação mais exuberante aos diluidores à base de leite pode ser provocada por uma reação de hipersensibilidade às caseínas e lactoglobulinas do mesmo.

Os diluidores de congelação contêm na sua composição glicerol e gema de ovo que podem provocar reações de hipersensibilidade e atraso na depuração uterina nas éguas susceptíveis à endometrite (Card, 2005; Palm et al., 2006).

4.3. Endometrite Bacteriana

A endometrite bacteriana pode ser causada por infecções venéreas, crônicas ou após a cobertura e a sua incidência é de 25-60% (Causey, 2007; Riddle, LeBlanc & Stromberg, 2007). As doenças sexualmente transmissíveis nos equinos são causadas por *Taylorella equigenitalis*, certos serotipos inespecíficos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Platt, Atherton & Orskov, 1976). A metrite contagiosa equina é a doença venérea causada pela *T. equigenitalis* e resulta em cervicite, vaginite e endometrite. Os garanhões podem ser portadores assintomáticos desta bactéria e transmiti-la para a égua, que vai apresentar uma descarga vaginal mucopurulenta dentro de uma semana após cobertura. Esta patologia é endêmica na Europa, onde foi observada uma forma mais insidiosa e com menos sinais clínicos (Brito & Barth, 2003; Watson, 2000). A contaminação do útero por flora oportunista fecal ou genital pode provocar uma infecção durante a cobertura, IA com sémen infetado ou manipulações do trato genital. Durante a cobertura natural ocorre normalmente maior contaminação uterina do que na IA, pois nesta última são aplicadas medidas de higiene e adicionados antibióticos aos diluidores (Rasmussen et al., 2015).

Como causas de endometrite foram implicadas ocasionalmente uma grande variedade de bactérias oportunistas aeróbias e anaeróbias, sozinhas ou em sinergismo com fungos e leveduras. Em relação às bactérias mais comumente isoladas, foi observada uma prevalência de aproximadamente 65% do *S. equi subsp. Zooepidemicus* e de 10% da *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Brito & Barth, 2003; Ferris, Bohn & McCue, 2015; Petersen et al., 2015).

4.4. Endometrite fúngica

A incidência de endometrite fúngica é significativamente menor em comparação com as endometrites bacterianas (Beltaire, Cheong & Silva, 2012). No entanto, estes microrganismos aparecem frequentemente em conjunto, sendo importante a sua identificação. O prognóstico de uma endometrite fúngica para a fertilidade futura é fraco a reservado (Dascanio, 2007).

Nas endometrites fúngicas, os microrganismos mais comumente isolados são a *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Mucor* spp. (Scofield, Wittenburg, Ferris, Gustafson & McCue, 2013). Recentemente foi reportado o isolamento de *Cladophialophora bantiana*, um microrganismo patogénico emergente (Rantala et al., 2015).

Os fungos são normalmente microrganismos oportunistas que se multiplicam devido a uma falha na imunidade humoral ou celular, presença de doenças endócrinas, ambientes húmidos, presença de focos necróticos, isquémicos ou infetados e tratamentos prolongados com antibióticos. Os antibióticos podem modificar a flora normal do trato reprodutivo caudal, perturbando as barreiras biológicas e permitindo assim o desenvolvimento excessivo dos fungos (Dascanio, Schweizer & Ley, 2001). A fonte mais comum das infecções fúngicas do trato reprodutivo tem origem fecal ou cutânea, não tendo sido ainda demonstrada a

transmissão destas infeções através da cobertura natural ou IA (Dascanio, 2007; Dascanio et al., 2001).

4.5. Endometrite crónica

Uma infeção crónica e a presença de uma população mista de microrganismos causam uma condição fibrótica grave, progressiva e irreversível que afeta o endométrio (Aresu et al., 2012; Hoffmann et al., 2009a; Hoffmann et al., 2009b). O influxo contínuo de linfócitos e plasmócitos para o útero contribui para a endometrose, que consiste em mudanças degenerativas crónicas, como o desenvolvimento de fibrose periglandular, perivascular ou difusa no estroma e alterações glandulares, como a dilatação quística, atrofia ou hipertrofia das glândulas. Este processo prejudica a função do endométrio e gestações futuras, causando infertilidade (Hoffmann et al., 2009a; Hoffmann et al., 2009b; Kenney, 1978).

5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA ENDOMETRITE

O diagnóstico das endometrites representa um desafio, dado que os sinais clínicos podem ser subtis e apenas detetados em certas fases do ciclo éstrico. A maior causa da progressão de uma inflamação uterina aguda para a cronicidade é a falha em identificar o agente causal, podendo ser difícil de detetar por métodos tradicionais (Leblanc & Causey, 2009). É, por isso, essencial, um correto diagnóstico etiológico e a caracterização do grau e tipo de inflamação de modo a estabelecer o tratamento adequado o mais rápido possível (Cadario, 2014; Maischberger et al., 2008).

O diagnóstico para identificação do agente compreende uma história reprodutiva detalhada e uma avaliação clínica completa, incluindo palpação transretal do trato reprodutivo e o uso de métodos auxiliares de diagnóstico, como ecografia transretal, exames vaginais e cervicais, endoscopia, cultura, citologia e histologia uterinas e ainda o uso de biomarcadores da inflamação uterina (Buczkowska et al., 2014; Leblanc & Causey, 2009).

5.1. Exame físico e sinais clínicos

É importante a identificação das éguas suscetíveis e o conhecimento da sua história reprodutiva, devendo estas ser submetidas a um exame detalhado do trato reprodutivo. Este exame clínico deve incluir a avaliação da condição corporal, da conformação perineal, vulvar e cervical e a avaliação de problemas podais previamente existentes (Leblanc, 2003). A perda de gordura na área perineal e fadiga muscular podem exacerbar o relaxamento perineal (Hurtgen, 2006). É importante verificar se o cérvix se encontra relaxado durante o estro e contraído no diestro (Maischberger et al., 2008).

Os sinais clínicos da endometrite podem estar disfarçados, mas pode ser observado corrimento vaginal não relacionado com o estro, edema durante o diestro, presença de fluido intrauterino, encurtamento do intervalo inter-éstrico e da fase lútea e redução da fertilidade

(Leblanc & Causey, 2009; Overbeck, Witte & Heuwieser, 2011; Sertich, 2007; Woodward & Troedsson, 2013). Nas endometrites bacterianas, os sinais clínicos variam consoante o agente causal, sendo marcadamente diferentes entre bactérias gram-positivas e gram-negativas (Leblanc & Causey, 2009). Existem ainda outros fatores que influenciam a sintomatologia, como a presença de tratamento prévio, a cronicidade da infeção, a existência de uma população mista de microrganismos e a extensão da infeção (local ou difusa) (Christoffersen et al., 2015; Leblanc & Causey, 2009; LeBlanc, 2008).

5.2. Ecografia uterina

A ecografia transretal do trato reprodutivo é essencial na avaliação não invasiva do útero e dos ovários, constituindo um método essencial de diagnóstico da endometrite. Normalmente é utilizada uma sonda linear de 5 megahertz (MHz) (Sertich, 2007). É fundamental uma monitorização ecográfica regular, de modo a detetar a presença e quantificar o volume de fluido intrauterino, que está relacionado com baixas taxas de gestação. Embora não esteja sempre presente, a observação de fluido no útero é considerado o principal sinal de endometrite, especialmente quando observado após a cobrição (Leblanc & Causey, 2009; LeBlanc, 2010; Liu, 2011). Normalmente é detetado ecograficamente entre as 6 e 36 horas pós-IA, mas pode aparecer durante o diagnóstico de gestação, 14 a 16 dias pós-IA (LeBlanc, 2010; LeBlanc, 2003). Todavia, a altura mais significativa para a sua deteção é durante a segunda metade do diestro, dado que nesta altura o cérvix encontra-se fechado e, numa égua saudável, o fluido deveria estar ausente ou ser mínimo (Adams, Kastelic, Bergfelt & Ginther, 1987).

No exame ecográfico, não é normalmente observada uma distribuição uniforme do fluido, sendo que este tem tendência a acumular-se no corpo do útero e na junção entre o corpo e os cornos uterinos, dado que o útero é um órgão expansível, que se encontra em suspensão e apresenta os cornos uterinos numa posição mais elevada (Jones, 1995). Deve ser realizada uma avaliação do fluido intrauterino quanto à profundidade (medição da distância maior), à ecotextura e à persistência do fluido (Card, 2005). Mais do que 2 cm da medida máxima de fluido intrauterino observada durante o estro, ou entre as 6 e as 36 horas pós-IA são considerados indícios de suscetibilidade à endometrite associada à cobrição (Barbacini, Necchi, Zavaglia & Squires, 2003; LeBlanc, 2010). Uma hiperecogenicidade do fluido está relacionada com a presença de PMN e detritos, indicativos de inflamação (Card, 2005). Linhas hiperecóicas espessas e curtas podem representar ar ou exsudado (Leblanc & Causey, 2009). Um conteúdo anecogénico normalmente é compatível com a presença de um transudado (Causey, 2007). Outro sinal importante de endometrite é a presença de edema uterino anormal, visualizado através da ecografia uterina (Leblanc & Causey, 2009). O edema pode ocorrer fisiologicamente devido à linfangiectasia ou devido à influência do estrogénio, durante o início do estro. É verificada a sua redução perto da altura da ovulação, devido à diminuição

da concentração desta hormona e o desaparecimento do edema remanescente após a ovulação (Cuervo-Arango & Newcombe, 2008). Para classificar o edema uterino pode ser utilizada uma escala modificada do sistema descrito por Samper (2009), em que há gradação do edema em 4 níveis. O grau 0 corresponde à ausência de edema; no grau I há dificuldade na identificação das pregas endometriais; no grau II há visualização das pregas e o cérvix tem um aspeto de espinhas de peixe; no grau III as pregas endometriais são facilmente identificáveis e possuem bordos hiperecóticos e centros hipoecóticos (como gomos de laranja); o grau IV corresponde a hiperedema, com pregas endometriais anormalmente espessas, bordos hiperecóticos e marcada hipoecogenicidade central, verificando-se perda da arquitetura normal dos gomos de laranja (Parrilla-Hernandez, Ponthier, Franck, Serteyn & Deleuze, 2014). Algumas causas não-inflamatórias de hiperedema são a incompetência cervical, reação vascular anormal ao estrogénio, patologia linfática ou atividade mioelétrica alterada (Leblanc & Causey, 2009; Parrilla-Hernandez et al., 2014). O hiperedema é considerado um marcador da patologia uterina durante o estro. Pode ocorrer presença conjunta de fluido e edema uterino, provavelmente devido a problemas da drenagem uterina (Parrilla-Hernandez et al., 2014).

Na ecografia é também possível visualizar estruturas anecogénicas redondas a irregulares dentro do útero, que correspondem a quistos uterinos e que podem causar redução da fertilidade quando interferem com a migração da vesícula embrionária ou com a função das glândulas endometriais (Adams et al., 1987; Sertich, 2007).

Pode ser utilizado um *software* mais avançado, como a ecografia com Doppler, que permite a avaliação da vascularização do útero. Distúrbios no fluxo uterino foram associados a quistos uterinos e elastose do endométrio (Ferreira et al., 2015).

5.3. Endoscopia do trato reprodutivo

O exame endoscópico é um método de diagnóstico capaz de estabelecer o grau e a importância clínica de lesões intrauterinas superficiais, podendo detetar quistos endometriais, aderências intrauterinas, corpos estranhos, neoplasias e a presença de exsudato (Sertich, 2007). A histeroscopia pode ser utilizada nas éguas nas quais se suspeita de endometrite subclínica, que podem apresentar lesões focais e aderências intrauterinas e nas éguas com histórico de cios silenciosos, que podem exibir cicatrizes e perda das pregas endometriais (Leblanc & Causey, 2009).

5.4. Técnicas de recolha de amostras endometriais para avaliação citológica, microbiológica e histológica

As técnicas utilizadas para a recolha de amostras do útero são a zaragatoa uterina, a escova citológica, a lavagem uterina de pequeno volume e a biópsia endometrial (Cocchia et al., 2012; Woodward & Troedsson, 2013). Existem vários estudos que comparam estas técnicas

relativamente à qualidade, celularidade e capacidade de detetar inflamação, sendo a avaliação histológica das amostras obtidas através da biópsia endometrial considerada o *gold standard* no diagnóstico de endometrite (Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011). Foi concluído que a escova citológica e a lavagem uterina de pequeno volume são superiores à zaragatoa na recolha de amostras representativas de uma vasta área uterina e na recolha de um maior número de células intactas, sem lesão do endométrio (Cocchia et al., 2012).

As medidas de higiene utilizadas durante a recolha das amostras são muito importantes para minimizar o risco de contaminação pelo trato reprodutivo inferior ou contaminação iatrogénica. Em qualquer uma das técnicas, a égua deve estar presa num tronco de contenção e a sua cauda deve ser amarrada. Toda a área perineal deve ser lavada e desinfetada com sabão e água e eventualmente uma solução de iodina, de modo a reduzir a contaminação do trato genital interno. Posteriormente deve-se secar esta região com toalhetes de papel descartáveis (Buczowska et al., 2014; Card, 2005; Ferris, Bohn & Mccue, 2015; Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011; Sertich, 2007).

As amostras podem ser colhidas em qualquer fase do ciclo éstrico, embora seja recomendada a sua colheita durante o estro, altura em que o risco de ocorrer uma infeção iatrogénica do útero é inferior, pois a capacidade de defesa uterina é maior nesta fase e o cérvix encontra-se relaxado, facilitando a recolha das amostras (Ferris et al., 2015; LeBlanc, Magsig & Stromberg, 2007; Sertich, 2007).

5.4.1. Zaragatoa uterina

A zaragota uterina é utilizada na recolha de amostras para citologia e bacteriologia, sendo recolhidas bactérias e células inflamatórias para o diagnóstico de endometrite aguda (Walter, Neuberg, Failing & Wehrend, 2012). A zaragatoa uterina é a técnica mais comumente utilizada, devido aos baixos custos, facilidade e segurança da recolha. Assim sendo, esta deve ser um procedimento de rotina antes da IA nas éguas suscetíveis (Maischberger et al., 2008; Overbeck et al., 2011).

O método da zaragatoa com dupla proteção implica o uso de uma dupla bainha de revestimento, que reduz o risco de contaminação da zaragatoa pela parte posterior do trato genital, garantindo assim uma amostra exclusivamente uterina. Esta técnica consiste na condução da zaragatoa protegida através da vagina em direção ao cérvix. A bainha interior da zaragatoa é introduzida através do cérvix em direção ao lúmen do útero, onde é transposta a proteção e a zaragatoa fica em contacto com o conteúdo uterino, sendo rodada várias vezes na parede do útero em diferentes direções, durante aproximadamente 1 minuto. A zaragatoa é retraída para a proteção interior e de seguida para a proteção exterior, evitando a sua contaminação (Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Defontis et al., 2011; Nielsen, 2005).

Para avaliação citológica, é realizado um esfregaço por aposição numa lâmina de microscópio estéril, rodando suavemente a zaragatoa. Para análise microbiológica, a zaragatoa é enviada

num meio de transporte adequado para o laboratório (Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Nielsen, 2005). Uma desvantagem desta técnica é o aparecimento de células distorcidas na citologia, dependendo da pressão aplicada na realização do esfregaço, dado que estas aderem às fibras do algodão da zaragatoa. Adicionalmente, o número total de células é reduzido dado que a amostra recolhida é relativa a uma pequena área da superfície endometrial (Cocchia et al., 2012; Defontis et al., 2011; Walter et al., 2012).

Este método pode levar a resultados falsos negativos, pois há recolha de amostras apenas de uma região do endométrio e, por isso, as infeções focais podem não ser detetadas. Adicionalmente, é mais difícil alcançar a região mais pendular do útero, onde deverão estar localizados mais microrganismos (Cadario, 2014; Overbeck et al., 2011).

5.4.2. Escova citológica

A recolha das amostras com uma escova citológica é realizada segundo o método descrito para as zaragatoas uterinas e é também protegida por uma bainha. Quando a escova fica em contacto com a parede uterina deve ser rodada no sentido dos ponteiros do relógio. Esta técnica é utilizada para avaliação citológica do útero, sendo realizado um esfregaço por aposição numa lâmina de microscópio (Cocchia et al., 2012).

A utilização da escova citológica tem sido considerada uma técnica superior em relação aos outros métodos de colheita de amostras, devido à sua mais fácil realização, menor custo e maior segurança, produzindo amostras com um maior grau de celularidade. Este método permite a recolha de células da superfície e também da profundidade do endométrio, podendo ser preferível a sua utilização para deteção de endometrite subclínica, em comparação com a biópsia endometrial (Buczkowska et al., 2014; Overbeck et al., 2011). No entanto, está associada frequentemente à presença de células fragmentadas e eritrócitos, provavelmente devido às fibras rígidas da escova que podem danificar as células. Deste modo, é necessária uma preparação cuidadosa do esfregaço de maneira a reduzir a distorção celular (Cocchia et al., 2012; Walter et al., 2012).

5.4.3. Lavagem uterina

A técnica de lavagem uterina de pequeno volume é um método de colheita do fluido uterino, quase tão eficiente no isolamento de microrganismos como a biópsia endometrial e pode ser realizado em qualquer fase do ciclo éstrico (Cadario, 2014). Este procedimento consiste na realização de uma lavagem uterina em que é instalado um volume pequeno, 60 a 150 mL, de uma solução estéril de Lactato de Ringer (LR), de tampão fosfato salino (PBS) ou de soro fisiológico, através da utilização de uma seringa ou um saco adaptado à extremidade de um cateter de lavagem uterina ou de uma pipeta de inseminação. Depois de colocar a solução no útero, o operador realiza uma massagem retal dos cornos uterinos durante aproximadamente 30 segundos, o que distribui o fluido uniformemente e permite o seu contato com uma maior

área de superfície uterina. O fluido é drenado de novo para a seringa ou saco estéreis por sucção ou pela gravidade e transferido para um tubo cônico estéril (50 mL).

Como alternativa pode ser realizada uma lavagem uterina de grande volume (1L), como demonstrado por Sikora et al. (2016), em que aproveitaram o fluido da lavagem uterina realizada como tratamento. Este procedimento consiste na utilização de 1L de uma solução estéril de LR ou de uma solução estéril salina tamponada, adaptada a um cateter de lavagem uterina que é introduzido no útero, através do cérvix. O fluido é depois removido por gravidade para a mesma garrafa. Seguidamente é desinfetada uma zona da garrafa que contém o fluido e é aspirado 50 mL para um tubo, através de uma agulha. Este mostrou ser um método eficaz de recolha de amostras para avaliação citológica da inflamação uterina.

Em qualquer uma das técnicas utilizadas, deve ser administrada ocitocina para facilitar a recuperação de todo o fluido utilizado, que pode ficar retido nas pregas endometriais edematosas (Cadario, 2014; Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Defontis et al., 2011; Ferris et al., 2015; LeBlanc, Magsig & Stromberg, 2007).

O fluido é avaliado macroscopicamente, através da observação do tubo que contém a amostra à luz e avaliação da transparência e quantidade de muco presente. Este é classificado em transparente, turvo ou transparente com fios de muco. O muco e turvação estão relacionados com a presença de *S. β-haemolyticus* e *E. coli* (Cadario, 2014; LeBlanc et al., 2007).

O fluido recolhido é centrifugado e o sobrenadante é eliminado com uma pipeta ou decantado e é dividido em duas partes, uma para cultura microbiológica e a outra é ressuspendida numa pequena porção de sobrenadante (1 mL) e com uma gota do sedimento é realizado um esfregaço. Alternativamente, para avaliação citológica, pode ser realizado um esfregaço com zaragatoa numa lâmina de microscópio (Cadario, 2014; Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Defontis et al., 2011; LeBlanc et al., 2007).

A vantagem desta técnica é a recolha de material de uma maior área da superfície uterina, o que nos dá uma amostra mais representativa. Isto é particularmente importante no caso de éguas com infertilidade crónica que apresentam lesões focais, dado que a lesão pode não ser descoberta com a utilização das outras técnicas, que se cingem a uma porção da parede uterina. Foi demonstrado que as culturas de lavagens uterinas têm o dobro da sensibilidade das culturas de zaragatoas uterinas (LeBlanc et al., 2007; Nielsen, 2005).

As desvantagens desta técnica prendem-se com o material extra que é necessário para a sua realização e com o tempo despendido a processar a amostra. Adicionalmente, podemos encontrar um maior número de células distorcidas do que com a técnica da escova citológica, sendo necessário tomar atenção ao tempo entre a colheita da amostra e a realização do esfregaço, que influencia a qualidade do mesmo. Como se centrifuga a amostra, há acumulação de mucoproteínas e detritos, o que pode dificultar a visualização e identificação das outras células. Pode haver maior irritação da mucosa do endométrio devido à manipulação transretal e ao atrito causado pela ponta do cateter, podendo ser encontrados

mais eritrócitos na citologia (Cocchia et al., 2012). Existe também um risco aumentado de infeção iatrogénica, podendo resultar em culturas falso positivas (Cocchia et al., 2012; Ferris et al., 2015; LeBlanc et al., 2007). No entanto, recentemente foi desenvolvida uma técnica de lavagem uterina de pequeno volume com dupla proteção, com maior sensibilidade e especificidade e que diminui o risco de contaminação, sendo uma boa alternativa à técnica clássica de lavagem uterina (Christoffersen et al., 2015).

5.4.4. Biópsia endometrial

A biópsia do endométrio é uma técnica muito útil de recolha de amostras para o diagnóstico da endometrite subclínica, sendo o método que providencia mais alterações fidedignas do endométrio e deteta ainda a distribuição e severidade dos processos inflamatórios. Foi demonstrado que a citologia e microbiologia realizadas a partir desta técnica são superiores em termos de sensibilidade e valor preditivo positivo. Num estudo realizado por Petersen, Nielsen, Lehn-Jensen e Bojesen (2009) foi demonstrado, através da hibridização fluorescente *in situ*, que o *S. zooepidemicus* reside em profundidade no endométrio em éguas com infeção crónica. A biópsia uterina demonstrou ser o melhor método de deteção desta bactéria, dado que recolhe amostras endometriais em maior profundidade (Nielsen et al., 2010).

As amostras são colhidas através de um instrumento esterilizado de biópsia, que atravessa o cérvix até ao lúmen uterino. Seguidamente o operador, através do reto, vai conduzir a pinça de biópsia para o local destinado (normalmente a base de um corno uterino). Depois de fechado, o instrumento de biópsia é retirado e a amostra é avaliada macroscopicamente quanto à consistência e tamanho (deverá ser superior a 2 cm) e é colocada num meio apropriado (Buczkowska et al., 2014; Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011). O útero não recebe qualquer inervação sensorial e por isso não é necessário anestesia local na realização da biópsia (Sertich, 2007).

O inconveniente desta técnica prende-se com o facto de ser mais invasiva, necessitar de equipamento específico e processamento adicional das amostras e do tempo despendido a examina-las e a transmitir os resultados. Assim, a sua relevância prática está restringida apenas a casos especiais (Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011). A única contraindicação conhecida deste procedimento é a sua utilização em éguas gestantes, pois há o risco de rutura das membranas fetais e de libertação de PGF2 α (Love, 2011).

5.5. Citologia endometrial

A citologia endometrial é uma das técnicas de diagnóstico de endometrites mais utilizadas, pois consiste num método fácil, rápido e barato (Kozdrowski et al., 2015). Foi demonstrado que uma percentagem significativamente maior de éguas é diagnosticada através da citologia endometrial, em comparação com a cultura uterina (Nielsen, 2005; Riddle et al., 2007). No entanto, este método de avaliação possui uma taxa de resultados falsos negativos elevada e

providencia informação limitada sobre a causa da inflamação. Por esta razão, a citologia deve ser realizada conjuntamente com a bacteriologia, pois a detecção associada de PMN e de potenciais microrganismos patogénicos é um forte indicador de endometrite, aumentando a sensibilidade no diagnóstico da mesma (Buczkowska et al., 2014; Cocchia et al., 2012; Overbeck et al., 2011). Contudo, uma correlação entre os resultados destas duas técnicas não é evidente, o que pode ser explicado pelo facto das zaragotas uterinas poderem falhar infeções locais, pela presença de preparações antibióticas no útero, infeção muito profunda ou irritação não infecciosa do endométrio (Cadario, 2014; Overbeck et al., 2011).

Os esfregaços obtidos por qualquer uma das técnicas de colheita de amostras anteriormente mencionadas devem ser deixados secar ao ar e corados dentro de duas horas, com uma coloração modificada de Wright's, como o Diff-Quik (Defontis et al., 2011; Overbeck et al., 2011).

Não existe um método estandardizado de interpretação das várias metodologias de avaliação citológica, não havendo uma concordância na interpretação dos resultados e na classificação da inflamação uterina (Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Defontis et al., 2011; Riddle et al., 2007; Walter et al., 2012). Recentemente foi sugerido que o mais correto para avaliar a citologia endometrial é utilizar a percentagem de PMN em relação às células endometriais (Kozdrowski et al., 2015). Assim sendo, a lâmina deve ser observada ao microscópio ótico numa ampliação de 400x e deve ser registado o número de PMN como uma percentagem das células observadas na lâmina. Um resultado positivo à citologia é indicativo de endometrite aguda, mas não existe um consenso relativamente ao valor limiar positivo indicativo de inflamação (Overbeck et al., 2011). Este varia entre diferentes autores, desde 0,5% a 5% (Card, 2005; Nielsen, 2005). Esta variação deve-se à existência de uma população de PMN residentes no endométrio de éguas saudáveis durante o estro, que é considerado fisiológico. (Card, Carley, Green & Chirino-Trejo, 2004; Card, 2005). Os sistemas de classificação mais recentes categorizam as amostras citológicas em não inflamatória (PMN <5%), inflamação ligeira (PMN 5-15%), inflamação moderada (PMN 15-30%) e inflamação grave (PMN >30%) (Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Riddle et al., 2007). Outro método de avaliação da inflamação é baseado na quantidade de PMN observados em 10 campos de alta potência (HPF). As amostras são classificadas em não inflamatória (0-2 PMN/campo), inflamação moderada (2-5 PMN/campo), inflamação grave (>5 PMN/campo) e hipocelular (poucas células epiteliais e nenhum PMN) (Cocchia et al., 2012; Ferris et al., 2015; Riddle et al., 2007).

Existem outros parâmetros úteis na interpretação de amostras citológicas que devem ser tidos em conta. Assim, após a realização da coloração, a lâmina deve ser observada ao microscópio ótico numa ampliação pequena (100x) de modo a ser avaliada a qualidade do esfregaço, sendo este classificado em boa, moderada e fraca qualidade. Para tal, é observado o conteúdo do fundo do esfregaço, considerando a quantidade de células intactas, distorcidas ou fragmentadas, a quantidade de detritos, contaminantes e mucoproteínas presentes. Um

esfregaço é de boa qualidade quando há preservação das células e é possível o seu reconhecimento individual, tem qualidade moderada quando há presença de detritos no fundo da lâmina, poucas células rebentadas e poucos amontoados de células e fraca qualidade quando existem muitas células distorcidas, sendo difícil a sua distinção individual (Defontis et al., 2011). Seguidamente, a lâmina é observada numa ampliação de 400x, na qual é calculada a celularidade da amostra, através da contagem do número de células endometriais em HPF e é avaliada a presença de outras células como eritrócitos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e células epiteliais e a eventual presença de cristais urinários, bactérias e fungos (Cadario, 2014; Cocchia et al., 2012; Defontis et al., 2011; Ferris et al., 2015).

Os esfregaços podem também ser fixados e corados com uma coloração de Gram, permitindo a diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, resultante de diferenças na composição e estrutura da parede celular das mesmas. Seguidamente, a lâmina deve ser observada ao microscópio ótico numa ampliação de 1000x (objetiva de óleo de imersão), de modo a diferenciar os microrganismos dos detritos. Nos esfregaços podem ser encontradas bactérias, livres ou dentro de PMN ou macrófagos, o que pode auxiliar na diferenciação entre uma contaminação da amostra ou da coloração utilizada, de uma endometrite infecciosa, respetivamente (Ferris et al., 2015). Devem ser contabilizadas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em HPF e registada a sua forma e arranjo (Card, 2005). Como existem poucos microrganismos tipicamente associados com a endometrite equina, as características das células quando coradas providenciam informação clínica muito útil. A presença de cocos Gram-positivos é consistente com uma infeção por *Streptococcus β-hemolyticus*. Os bacilos Gram-negativos tipicamente isolados de éguas com endometrite incluem a *E. coli*, *P. aeruginosa* e a *K. pneumoniae* (Sertich, 2007).

5.6. Microbiologia endometrial

O método mais comum de identificação etiológica de endometrites infecciosas é a cultura aeróbia das amostras obtidas, tendo em conta a morfologia das colónias e as reações bioquímicas (Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011; Sertich, 2007; Troedsson, 2011).

Podem ocorrer resultados falsos positivos por contaminação da amostra com microrganismos provenientes do trato genital caudal ou do meio ambiente (Buczkowska et al., 2014; Cadario, 2014; LeBlanc et al., 2007). Na ausência de sinais clínicos, o isolamento de bactérias, particularmente uma cultura mista de mais de três microrganismos, é normalmente indicativo de contaminação (Sertich, 2007). Foi demonstrado que a porção caudal do trato genital possui, fisiologicamente, um número considerável de microrganismos, incluindo o *S. zooepidemicus* e a *E. coli* (Petersen et al., 2015; Sertich, 2007). A pele também possui microrganismos comensais, como o *Bacillus* spp. e o *Micrococcus* spp., que podem diminuir as taxas de gestação em éguas velhas e inférteis (Riddle et al., 2007). Para minimizar

qualquer má interpretação dos resultados, estes devem ser sempre interpretados em conjunto com o resultado da citologia ou da biópsia endometrial (Sertich, 2007; Troedsson, 2011).

Foram encontradas várias correlações entre a ecografia, a cultura e a citologia do endométrio. O fluido intrauterino foi detetado ecograficamente mais frequentemente nas éguas infetadas por *Streptococcus* β -hemolyticus, *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae* ou fungos (Burleson, LeBlanc, Riddle & Hendricks, 2010). No estudo realizado por Rasmussen et al. (2015), verificou-se um grau de edema endometrial maior nas éguas diagnosticadas posteriormente com *Streptococcus* spp. No entanto, nem sempre o isolamento de microrganismos está associado a uma resposta inflamatória, verificando-se que o grau de inflamação observada na citologia endometrial varia consoante a bactéria (Riddle et al., 2007). Os *Streptococcus* β -hemolyticus e a *Klebsiella* spp. estão relacionados com uma maior frequência de citologias uterinas positivas, ao contrário da *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas* spp. (Burleson et al., 2010; Riddle et al., 2007). Estas últimas são menos prováveis de evidenciar sinais de inflamação porque produzem muco de alta viscosidade e escapam às defesas imunitárias (Overbeck et al., 2011).

As zaragatoas obtidas pelas técnicas anteriormente mencionadas devem ser rapidamente colocadas num meio de transporte, como o meio de Amies ou o meio de Stuart modificado, sendo posteriormente enviadas para um laboratório. Estes meios mantêm a viabilidade dos microrganismos sem que haja sobrecrecimento bacteriano, tendo a capacidade de preservar os mesmos por um período de 72 horas se a amostra for mantida entre os 15 e 30°C. Após 48h as culturas podem ser categorizadas pelo crescimento de bactérias patogénicas em monoculturas (mais de 90% de uma espécie), sem crescimento bacteriano ou contaminação. (Buczowska et al., 2014; Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011).

Existem várias bactérias patogénicas para o ambiente uterino que foram isoladas em diferentes percentagens, com diversos métodos de colheita e em distintas áreas geográficas. Os microrganismos isolados foram os *Streptococcus* β -hemolyticus (mais frequente), *S. zooepidemicus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Pasteurella* sp., *Citrobacter* sp., *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (Sertich, 2007). Deve ser realizado um teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA), com o intuito de determinar quais os antibióticos adequados e eficazes no tratamento da infeção uterina (Sertich, 2007).

Os *Streptococcus* β -hemolyticus são os microrganismos mais isolados e estão relacionados com uma subida do pH na lavagem uterina de pequeno volume (LeBlanc et al., 2007). A *E. coli* pode causar subfertilidade e está associada a infeções focais, sob a forma de placas granulomatosas (LeBlanc et al., 2007; Overbeck et al., 2011). A interpretação do seu isolamento é difícil, dado que pode por vezes ser considerada um contaminante. Assim, apenas culturas puras e com um número elevado de colónias são consideradas significativas. (LeBlanc et al., 2007; Nielsen, 2005; Walter et al., 2012). A *P. aeruginosa* está relacionada com infeções crónicas e persistentes e com a produção de biofilme (LeBlanc, 2010).

5.7. Histologia endometrial

A análise histológica do endométrio é considerada o *gold standard* no diagnóstico de endometrite, particularmente devido à detecção da infiltração de PMN no epitélio luminal e no estrato compacto (Nielsen, 2005). A avaliação histológica das amostras permite detetar diversas alterações e avaliar a integridade estrutural do endométrio em relação à presença de fibrose periglandular e dilatação das glândulas endometriais e dos vasos linfáticos (Sertich, 2007). Providencia ainda informações sobre a cronicidade, severidade e distribuição das lesões, consistindo no único meio de diagnóstico preditivo da fertilidade, uma vez que deteta processos degenerativos (Leblanc & Causey, 2009).

A biópsia endometrial mostra, de forma fiável, as alterações degenerativas e inflamatórias do endométrio. É avaliada segundo vários parâmetros, sendo os principais a fibrose, inflamação, presença de agentes infecciosos e a heterogeneidade endometrial (Snider et al., 2011). Atualmente, o esquema de categorização utilizado como padrão é o sistema modificado de Kenney-Doig. Este esquema baseia-se na identificação e quantificação das alterações histológicas do útero segundo o grau de inflamação crónica, fibrose e atrofia endometrial e correlaciona a severidade destes achados com a idade da égua, a sua história reprodutiva e a fertilidade (Kenney & Doig, 1986; Leblanc & Causey, 2009; Overbeck et al., 2011). As amostras são classificadas na categoria I, IIA, IIB e III. A categoria I está associada com uma probabilidade de conceção superior a 80% e com um endométrio normal, com alterações mínimas. O grau II divide-se em duas subcategorias, IIA e IIB, que vão desde condições patológicas ligeiras a moderadas. Biópsias de categoria IIA correspondem a uma probabilidade de conceção entre os 50-80%. Na categoria IIB esta probabilidade está entre os 10-50%. Amostras classificadas como pertencendo à categoria III correspondem a uma probabilidade de conceção inferior a 10% e estão associadas a uma inflamação grave do endométrio e/ou mudanças degenerativas do mesmo (Sertich, 2007). As éguas de grau IIB e III mostraram uma maior incidência de retenção de fluido intrauterino (Woodward et al., 2012).

5.8. Biomarcadores da endometrite

A mieloperoxidase é uma enzima pro-oxidante armazenada e libertada pelos PMN durante a sua desgranulação ou lise celular. Recentemente, foi confirmada a sua presença no lúmen uterino, em situações de endometrite e fisiológicas, como durante o estro. De facto, foi demonstrado que a concentração desta enzima é superior nas éguas afetadas pela endometrite, verificando-se uma correlação positiva com a presença de fluido intrauterino e com resultados citológicos positivos (Parrilla-Hernandez et al., 2014).

Outro biomarcador que pode ser utilizado é o NO. Como mencionado anteriormente, este relaxante muscular compromete a contractibilidade do miométrio e, consequentemente, a depuração uterina (Liu, 2011). Foi observado que as éguas susceptíveis apresentaram uma

maior quantidade de NO do que as éguas resistentes, após IA, sugerindo um papel desta molécula na endometrite (Alghamdi et al., 2005).

6. TRATAMENTO DA ENDOMETRITE

O tratamento da endometrite tem como objetivo o controlo do grau e duração da inflamação, correção de defeitos nas defesas uterinas, auxílio na remoção física dos produtos da inflamação e identificação e eliminação dos microrganismos patogénicos, de modo a preparar o endométrio para a chegada do embrião, que ocorre por volta dos 5,5 dias pós-IA (Leblanc & Causey, 2009; LeBlanc, 2010; Maischberger et al., 2008). Após a cobertura, os espermatozoides podem demorar até 4 horas a atingir o oviduto. Deste modo, o tratamento deve ser iniciado após este período de tempo e não deve ultrapassar os 2 dias pós-IA, pois a partir desta altura a concentração de progesterona é muito elevada, havendo diminuição da eficiência dos mecanismos de defesa uterina (Pycock, 2007). Assim, o tratamento das infeções uterinas deve ser realizado durante o estro, altura em que as defesas do útero estão elevadas (Causey, 2007).

É essencial a resolução dos problemas subjacentes para o sucesso do tratamento. Se existir algum defeito anatómico pode ser necessária uma correção cirúrgica, como por exemplo a realização de uma vulvoplastia de Caslick, cuja necessidade de resolução é indicada através da medição do índice de Caslick (Rambags, Colenbrander & Stout, 2003).

O protocolo terapêutico é específico para cada caso, sendo comum a utilização da lavagem uterina, antibioterapia e antifúngicos, uso de mucolíticos e agentes quelantes, ocitócitos e imunomoduladores. A administração de ocitócitos e as lavagens uterinas constituem a primeira linha de tratamento. Todos estes procedimentos devem ser realizados com cuidados de limpeza e higiene, minimizando o risco de contaminação uterina. O exercício físico também é vantajoso para a depuração do útero, através do aumento da pressão intra-abdominal associada com os movimentos (Causey, 2007). Após a conclusão do tratamento, deve ser realizado um exame físico e uma zangaratoa ou biópsia uterina após 3 a 4 semanas do início do mesmo, de modo a confirmar o seu sucesso (Pasolini et al., 2016).

6.1. Ocitócitos

A administração sistémica de fármacos ocitócitos constitui um método não invasivo que auxilia na remoção do fluido intrauterino através do cérvix, estimula a contração do miométrio e a drenagem linfática, contribuindo deste modo para o aumento da fertilidade (Pycock, 2007).

A ocitocina é um dos ocitócitos mais comumente utilizados, na dose de 10 a 25 UI, IV ou IM (Knutti, Pycock, Weijden & Küpfer, 2000). A sua administração durante o estro induz contrações uterinas de grande amplitude que duram 30 minutos a 1 hora e que se traduzem numa eliminação rápida do fluido intrauterino. A resposta do útero à ocitocina parece estar relacionada com o efeito direto desta hormona no miométrio e com o seu efeito indireto na

libertação de PGF2 α . O seu tempo de semi-vida é muito curto, aproximadamente 8 minutos, e por isso são necessárias administrações repetidas de modo a aumentar a eficácia do tratamento (Leblanc & Causey, 2009; LeBlanc, Neuwirth, Mauragis, Klapstein & Tran, 1994; Paccamonti et al., 1999). Como alternativa, pode ser administrada carbetocina. Esta hormona é um análogo de longa ação da ocitocina, que possui um tempo de semi-vida de 17 minutos e está indicada nas situações em que é necessário uma contração uterina mais prolongada (Pycock, 2007; Schramme, Pinto, Davis, Whisnant & Whitacre, 2008).

Nos casos em que o cérvix não dilata, pode ser necessária a associação dos ocitócitos com a aplicação tópica cervical de misoprostol, 2 a 4 horas antes da cobertura. Este é um análogo sintético da PGE1 que causa relaxamento do cérvix (Leblanc & Causey, 2009).

É também recomendada a utilização de outros fármacos, como o cloprostenol, particularmente no caso de ocorrer uma menor resposta à ocitocina. Este trata-se de um análogo sintético da PGF2 α e deve ser administrado numa dose de 250 μ g, antes da ovulação ou dentro de 12 horas. É aconselhável não ultrapassar este período de tempo, dado que o cloprostenol pode promover a diminuição de progesterona, afetando negativamente a taxa de gestação. Esta hormona induz contrações uterinas de baixa amplitude durante 2 a 4 horas, sendo recomendado o seu uso nas éguas que possuem estase linfática ou quistos linfáticos. (Leblanc & Causey, 2009; Pycock, 2007).

6.2. Lavagem uterina

A lavagem uterina auxilia na remoção de detritos, microrganismos, PMN e outras substâncias que podem interferir com a absorção de antibióticos pela mucosa uterina e com a ação dos PMN e contribui para a depuração do útero através da estimulação das contrações do miométrio. Adicionalmente, este tratamento provoca irritação mecânica do endométrio, o que contribui para o recrutamento de novos PMN (Leblanc & Causey, 2009).

A opção de utilizar esta terapêutica está relacionada com a presença de fluido intrauterino e com o grau de edema endometrial. Antes da IA, deve ser realizada uma ecografia uterina e pode ser efetuada uma lavagem do útero no caso das éguas suscetíveis que apresentem fluido intrauterino com mais de 2 cm de medida máxima. Deve ser executada outra ecografia 4 a 8 horas após a IA e, na presença de fluido intrauterino (> 2 cm) deve-se proceder a uma lavagem uterina (Leblanc & Causey, 2009; Pycock, 2007). Deve ser feita nova monitorização ecográfica 24 horas pós-IA, de modo a verificar se é necessário repetir o tratamento (Brito & Barth, 2003).

O procedimento da lavagem uterina consiste na utilização de 1L de uma solução estéril de LR ou de uma solução estéril salina tamponada, adaptada a uma sonda de lavagem uterina, que é introduzida no útero, através do cérvix. Pode ser adicionado um pequeno volume (5 a 10 mL) de solução de iodopovidona à solução de lavagem, como tratamento preventivo antibacteriano e antifúngico. No entanto, foi demonstrado que esta administração pode alterar

as concentrações de progesterona, reduzindo a sobrevivência do embrião (Kalpokas et al., 2010). Pode ser realizada uma massagem uterina transretal de modo a distribuir uniformemente a solução pelos cornos uterinos e para estimular as contrações do miométrio. O fluido é depois removido por gravidade e pode ser necessário repetir a lavagem até este sair limpo (Pycock, 2006). Deve ser administrado um ocitócito como adjuvante na eliminação completa do fluido administrado (Leblanc & Causey, 2009; Pycock, 2007).

6.3. Tratamento antibiótico

O tratamento antibiótico tem como objetivo a destruição das bactérias responsáveis pela infecção uterina que não foram eliminadas com a administração de ocitócitos e com a realização de lavagens uterinas (Causey, 2007). Deve ser confirmada previamente a presença de bactérias, efetuado o seu isolamento e um TSA, de modo a ser administrado o antibiótico adequado a cada caso. No entanto, isto nem sempre é possível, sendo que nestes casos devem ser utilizados antibióticos de largo espectro e devem ser tidas em consideração as bactérias mais comumente isoladas (LeBlanc, 2010). O uso da terapia antibiótica tem vindo a decrescer, provavelmente devido às preocupações relacionadas com a resistência antibiótica e indução de infeções fúngicas secundárias e como resultado da eficácia do tratamento com ocitócitos e lavagem uterina (Dascanio, 2011).

As infeções são normalmente limitadas ao endométrio e, por essa razão, a infusão intrauterina de antibióticos é a abordagem terapêutica mais utilizada. No entanto, em infeções mais profundas, como as causadas pelo *S. zooepidemicus*, pode ser necessário antibioterapia sistémica. Adicionalmente, com a administração sistémica existe menor flutuação da concentração do antibiótico e não há perigo de contaminação do útero (Causey, 2007; Dascanio, 2011; Petersen et al., 2009).

Deve ser realizada uma infusão intrauterina do antibiótico apropriado, após a realização de lavagens uterinas que eliminam o material orgânico que pode interferir com a atuação do antibiótico. Foi sugerido que a infusão de 30 a 200 mL de antibiótico é distribuída por todo o útero. É preferível a administração de volumes pequenos, de modo a não ocorrer refluxo da solução para o cérvix e consequente distribuição inadequada no endométrio (Perkins, 1999). Podem ser utilizados diluentes aquosos estéreis, como a água, solução salina ou LR. Os aminoglicosídeos ácidos devem ser tamponados com uma solução de igual volume de bicarbonato de sódio de modo a minimizar a irritação da mucosa (Causey, 2007).

Os antibióticos mais comuns utilizados nas infusões intrauterinas são o ceftiofur, seguido da gentamicina, ticarcilina com ácido clavulânico, ampicilina, penicilina procaína, amicacina, penicilina potássica e ticarcilina (Dascanio, 2011). O tratamento deve ser realizado durante o estro e a duração do mesmo depende do grau de inflamação, variando entre 3 dias na endometrite ligeira, 5 dias na moderada e 7 dias na inflamação grave (Perkins, 1999).

Nos casos em que existe doença generalizada, infecção ou inflamação das camadas mais profundas do útero, falha terapêutica de infusões intrauterinas repetidas e recontaminação, deve ser utilizado um protocolo terapêutico combinado de antibioterapia local e sistêmica. Os antibióticos mais utilizados a nível sistêmico são o sulfametoxazol com trimetopim, ampicilina, penicilina, gentamicina e administração oral de enrofloxacin (Pasolini et al., 2016).

6.4. Agentes mucolíticos e quelantes

A administração de fármacos mucolíticos tem como objetivo a eliminação do excesso de muco e exsudados, associados à endometrite persistente. A hipersecreção de muco pelo epitélio endometrial e a presença de exsudados torna os aminoglicosídeos quimicamente inertes e interfere com a penetração dos antibióticos e com o transporte de sêmen para o oviduto (Causey et al., 2000). A endometrite persistente pode estar associada com a produção de biofilme, que consiste numa matriz adesiva que refugia microcolônias bacterianas e resiste à penetração de antibióticos. A produção de biofilme está associada principalmente com a *P. aeruginosa*, mas também com o *S. epidermis*, *E. coli*, *E. cloacae* e fungos (LeBlanc, 2010). Assim, torna-se importante a adição de agentes mucolíticos à solução de lavagem uterina, numa tentativa de eliminar o exsudado, muco e biofilme (Leblanc & Causey, 2009). Contudo, existe ainda alguma controvérsia em relação a estes fármacos quando usadas outras vias de administração, não tendo sido confirmado o efeito mucolítico intrauterino da sua administração oral.

Existem vários tipos de agentes mucolíticos, que incluem a N-acetilcisteína (NAC), o dimetilsulfóxido (DMSO) e querosene (Leblanc & Causey, 2009). A NAC quebra as ligações dissulfeto dos polímeros de mucina, reduzindo assim a viscosidade do muco. Adicionalmente, possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas e auxilia no transporte do sêmen para o oviduto (Duru et al., 2008; Estany et al., 2007). Foi demonstrado que a sua aplicação em éguas saudáveis durante o estro reduz a resposta endometrial aos agentes irritantes e que a sua infusão pré e pós-IA está associada com um aumento da taxa de gestação (Gores-Lindholm et al., 2013; Leblanc & Causey, 2009; Melkus, Witte, Walter, Heuwieser & Aurich, 2013). O DMSO é outro agente mucolítico cuja infusão numa solução de 30% mostrou melhorias na classificação da biópsia endometrial e aumento da taxa de gestação (Ley, Bowen, Sponenberg & Lessard, 1989). O querosene é um composto que ativa as glândulas endometriais e que tem ação mucolítica através da destruição do epitélio uterino, o que permite a regeneração do mesmo e estabelecimento de um aparelho mucociliar regenerado. A administração deste composto resulta numa endometrite grave a moderada, caracterizada por edema difuso e produção de um exsudado seroso. Por esta razão, o uso do querosene permanece controverso (Bradecamp, Ahlschwede & Cook, 2014; Leblanc & Causey, 2009). Estratégias de tratamento mais avançadas incluem a infusão uterina de agentes quelantes tamponados que promovem a penetração dos antibióticos. O seu mecanismo de ação não é

completamente claro, mas pensa-se que ao ficarem em contato indireto com a parede celular das bactérias, estes compostos vão alterar a integridade e permeabilidade da mesma, através da quelação do cálcio e/ou do magnésio da membrana externa (LeBlanc, 2010). Foi recomendada a infusão uterina conjunta de *Tris*-EDTA ou *Tricide* e antibióticos (Farca, Nebbia & Re, 1993; Wooley & Jones, 1983). Após 12 a 24 horas, o útero deve ser lavado para remoção de detritos acumulados. Se for recuperado um fluido turvo ou mucoso, o tratamento é repetido mais uma vez (Buczkowska et al., 2014).

6.5. Imunomoduladores

A terapêutica com imunomoduladores tem como objetivo o equilíbrio da expressão das citocinas pro e anti-inflamatórias e a reposição da homeostasia da resposta inflamatória local, contribuindo para a redução da endometrite associada à cobrição e para o aumento da taxa de gestação (Fumuso et al., 2003; Pasolini et al., 2016).

Podem ser utilizados corticosteroides, como os glucocorticoides, que suprimem a resposta imunitária, reduzem a expressão das citocinas pro-inflamatórias, melhoram os mecanismos de defesa uterina e estimulam a resposta anti-inflamatória. Assim, uma terapia de curta duração com corticosteroides pode ser benéfica no tratamento da endometrite associada à cobrição, havendo diminuição da severidade e duração da resposta inflamatória (Leblanc & Causey, 2009; Wolf, Maslchitzky, Gregory, Jobim & Mattos, 2012). No entanto, o tratamento com corticosteroides deve ser usado com precaução, uma vez que podem exacerbar a infecção nas éguas com endometrite bacteriana (Leblanc & Causey, 2009).

Recentemente foram desenvolvidos novos tratamentos imunomoduladores, que induzem uma resposta celular não específica que conduz predominantemente à ativação de macrófagos e liberação de citocinas. Foi demonstrado que os extratos da parede celular da *Mycobacterium phlei* (MCWE) e a suspensão de *Propionibacterium acnes* têm um papel benéfico na resolução de infecções causadas pelo *S. equi* subsp. *zooepidemicus* e na endometrite crônica, respetivamente (Christoffersen et al., 2012; Leblanc & Causey, 2009). As células estaminais mesenquimais e o soro autólogo condicionado podem também ser utilizados na modulação da resposta inflamatória (Ferris, Frisbie & McCue, 2014). Foi ainda sugerido que infusões de pequenos volumes de plasma rico em plaquetas, pré ou pós-IA, contribuem para um ambiente uterino adequado, melhorando a taxa de concepção. Embora aparentemente aumentem a fertilidade, são necessários mais estudos sobre estas novas terapêuticas (LeBlanc & McKinnon, 2011; Metcalf, 2014; Reghini et al., 2014).

6.6. Tratamento antifúngico

O tratamento de endometrites fúngicas é um processo demorado, sendo essencial o estabelecimento de um protocolo terapêutico adequado, que inclui a correção de fatores predisponentes e uma combinação de lavagens uterinas, infusões intrauterinas e sistêmicas

de agentes antifúngicos e administração de fármacos ocitócitos. Todos os tecidos do trato reprodutivo que possam alojar estes microrganismos devem ser sujeitos a tratamento, como o clitóris, fossa clitoriana, vagina, cérvix e útero. É conveniente a realização do isolamento do microrganismo e de um teste de sensibilidade a antifúngicos, que serve de base para a escolha do agente antifúngico. Normalmente, o tratamento é realizado localmente, através do contato direto com os tecidos afetados. No entanto, a administração por via sistêmica pode ser benéfica em infecções muito extensas (Dascanio, 2007).

Existem duas categorias principais de antifúngicos, os fármacos poliênicos e os derivados imidazólicos. Os fármacos poliênicos mais utilizados são a anfotericina B, a nistatina e a natamicina. Os derivados imidazólicos mais utilizados são o clotrimazol, miconazol, econazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol. A anfotericina B, o clotrimazol e o miconazol são eficazes contra a *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. A nistatina e o fluconazol são apenas eficazes contra a *Candida* spp (Dascanio, 2007, 2011). Quando não é possível a realização de culturas e testes de sensibilidade, devem ser utilizados fármacos poliênicos no tratamento empírico, dado que foi demonstrado, *in vitro*, que estes são eficazes contra os fungos isolados do útero (Beltaire et al., 2012).

Está ainda descrito que os antifúngicos possuem uma eficácia maior em meios ácidos, sendo por isso benéfico a realização de uma lavagem uterina prévia com uma solução de ácido acético a 2% ou iodopovidona a 0,05%. O DMSO também está descrito como tratamento complementar de endometrite fúngica, devido à sua atividade contra o crescimento da *C. albicans*, *in vitro* (Dascanio, 2007; Dascanio et al., 2001).

PARTE III - ESTUDO DA ABORDAGEM DA ENDOMETRITE NUM CENTRO DE REPRODUÇÃO EQUINA

1. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo da abordagem das endometrites num centro de reprodução equina, com o intuito de:

- 1 - Avaliar a influência de diferentes variáveis no aparecimento de fluido uterino à ecografia pós-IA ou cobrição: idade da égua, o tipo de reprodução, o tipo de sémen e a repetição da IA ou salto;
- 2 - Avaliar a influência de diferentes variáveis no diagnóstico de gestação: presença de fluido uterino, idade da égua; presença e grau de inflamação uterina; repetição da lavagem uterina e tratamento adicional;
- 3 - Correlacionar a presença e a quantidade de fluido uterino com a percentagem de neutrófilos e com a presença de bactérias e linfócitos;
- 4 - Verificar se a correlação entre a presença de fluido uterina e a inflamação foi semelhante antes e depois da IA ou cobrição;
- 5 - Avaliar a viabilidade da avaliação ecográfica da presença e quantidade de fluido uterino como método de diagnóstico da presença e grau da inflamação uterina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho centrou-se na análise dos dados relativos à época reprodutiva de 2017 do Centro de Recolha e Congelação de Sémen Equino pertencente à Luso-Pecus, Lda. Uma parte laboratorial deste trabalho foi desenvolvida na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, em concreto no Laboratório de Bacteriologia e Imunologia, onde foi realizada a coloração De Gram dos esfregaços obtidos a partir das lavagens uterinas e posterior avaliação dos mesmos e no Departamento de Anatomia Patológica, onde foi feito o registo fotográfico das preparações microscópicas para posterior avaliação.

2.1. Amostra

A amostra em estudo foi constituída por 186 éguas (n=186) monitorizadas ao longo da época reprodutiva de 2017, das quais 54 permaneceram no Centro pertencente à Luso-Pecus, Lda. e 132 foram monitorizadas em explorações de clientes. A maioria das éguas são da raça Puro Sangue Lusitano (n=165) e apresentaram idades compreendidas entre os 3 e os 22 anos. Estas éguas foram cobertas naturalmente ou sujeitas a IA com sémen refrigerado ou congelado, proveniente de 37 garanhões de fertilidade comprovada, dos quais 22 para utilização do sémen refrigerado, 15 para sémen congelado e 6 desses garanhões também

cobriram naturalmente as éguas. A maior parte dos garanhões utilizados são da raça Puro Sangue Lusitano e apresentaram idades compreendidas entre os 3 e os 21 anos.

Para este estudo foram estabelecidas fichas individuais para cada égua, nas quais se registaram vários parâmetros. A partir dessas fichas foram criados 3 grupos, como indicado na tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização dos grupos utilizados no trabalho experimental e das variáveis analisadas em cada grupo

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Geral: n=186	Pós-IA ou cobrição: n=34	Pré-IA ou cobrição: n=10
Grupo geral que engloba a totalidade da amostra, com o registo do primeiro ciclo em que cada égua foi coberta ou inseminada	Grupo pós-IA ou cobrição, que engloba as éguas submetidas à primeira lavagem uterina às 24 horas pós-IA ou cobrição, com posterior avaliação citológica	Grupo pré-IA ou cobrição, que engloba as éguas submetidas a lavagem uterina com posterior avaliação citológica pré-IA ou cobrição
Variáveis analisadas	Variáveis analisadas	Variáveis analisadas
<ul style="list-style-type: none"> - Idade; - Tipo de reprodução; - Tipo de sêmen; - Repetição da IA ou salto; - Presença de fluido uterino; - Diagnóstico de gestação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fluido uterino medido em cm; - Presença de inflamação; - Grau da inflamação; - Presença de bactérias; - Presença de linfócitos; - Repetição da lavagem uterina; - Tratamento adicional; - Diagnóstico de gestação. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fluido uterino medido em cm; - Presença de inflamação; - Grau da inflamação; - Presença de bactérias; - Presença de linfócitos.

n = éguas utilizadas

Os critérios de inclusão neste estudo foram:

- Cada égua possuir um único registo por grupo: primeiro ciclo em que foi coberta ou inseminada (Grupo 1) ou primeira lavagem uterina realizada (Grupo 2 e 3). Foram incluídas no grupo 2 apenas as éguas que não apresentaram fluido uterino antes da IA ou cobrição;
- Não ter sido realizado tratamento prévio à lavagem uterina;
- O fluido de lavagem recolhido representar uma amostra exclusivamente uterina. Foram excluídas as lavagens uterinas nas quais não foi possível desacoplar a tempo a sonda de lavagem da garrafa da solução de lavagem recolhida, tendo esta sido conspurcada com fluidos da cavidade vaginal;
- Os esfregaços avaliados citologicamente serem de boa qualidade. Foram eliminadas deste estudo as lâminas que apresentaram má qualidade, com presença de células endometriais distorcidas, em que não foi possível a sua contabilização.

Adicionalmente, foram realizadas algumas citologias extra, com o intuito de avaliar a evolução da inflamação e infeção uterinas através de uma análise descritiva dos resultados obtidos. Deste modo, foram realizadas citologias endometriais das éguas do grupo 2 sujeitas a lavagens repetidas, bem como uma avaliação citológica das lavagens uterinas de 7 éguas do grupo 3 que apresentaram fluido uterino após a IA ou cobertura.

2.2. Recolha e processamento do sémen

As doses inseminantes utilizadas foram concebidas no Centro de Recolha e Congelação de Sémen Equino pertencente à Luso-Pecus, Lda. Os procedimentos de recolha, processamento, congelação e descongelação de sémen utilizados neste estudo foram uniformes e seguiram a metodologia adotada por este Centro.

As recolhas de sémen foram realizadas com uma vagina artificial INRA® (IMV, Ref:021933), previamente preenchida com água quente a uma temperatura adequada e lubrificada com um gel não espermicida. Foi utilizada uma manga de revestimento descartável acoplada na extremidade a um copo coletor esterilizado com um filtro incorporado. As recolhas foram realizadas através da utilização de um manequim fixo e/ou da égua residente no Centro. Após a recolha, foi medido o volume do ejaculado e a concentração espermática (através de um espectrofotómetro Accuread, Ref:021376, da IMV) e foi realizada a avaliação do ejaculado ao microscópio ótico (Olympus, modelo CH30, Ref:200). O sémen foi processado de modo a ser utilizado refrigerado com, no mínimo, 400×10^6 espermatozoides com movimentos progressivos e retilíneos. Durante o processamento da dose inseminante todos os ejaculados foram centrifugados durante 10 minutos a 363 g, numa centrífuga Nahita (Modelo 2740, Ref:52740000) e posteriormente foi retirado todo o sobrenadante. Procedeu-se a uma ressuspensão dos espermatozoides com um diluidor previamente aquecido à temperatura de 37°C em banho-maria. Neste estudo foram adicionados 4 tipos de diluidores diferentes: no caso do sémen refrigerado foram utilizados dois diluidores à base de leite, o INRA96® (Ref: 016441, IMV) e o EquiPlus® (Ref:13570/0201, Minitube); no caso do sémen congelado foram utilizados dois diluidores à base de gema de ovo, o Gent® (Ref: 13571/1045, Minitube) e o Botu-crio® (Ref:ET.AB551-WE01, Nidcacon).

O sémen congelado utilizado neste estudo já tinha sido anteriormente processado com 800×10^6 espermatozoides com movimentos progressivos e retilíneos por dose e armazenado nos contentores de azoto fluido do Centro. Previamente à IA, as palhinhas que continham o sémen foram descongeladas em banho-maria a 37°C, durante 60 segundos.

2.3. Controlo reprodutivo: monitorização ecográfica e tratamento da endometrite

Todas as éguas (n=186) foram submetidas a um controlo reprodutivo baseado na monitorização antes da cobertura ou da IA, que consistiu na avaliação e registo da fase reprodutiva das mesmas, através do exame do trato reprodutivo por palpação e ecografia

transretal, utilizando um ecógrafo com sonda linear de 5 MHz (EMP V9 Portable Veterinary Ultrasound). Para cada égua foi criada uma ficha de controlo reprodutivo, em que foram registadas as características do trato reprodutivo observadas por ecografia transretal, nomeadamente o crescimento folicular, as características do útero e ainda os tratamentos utilizados. O edema endometrial foi classificado numa escala de 0 a 4, de um edema menor para um edema maior, sendo 0 a ausência de edema e grau 4 a presença de hiperedema. Foi ainda avaliada e registada a presença de fluido intrauterino e realizada uma medição ecográfica (em cm) da sua medida maior (em linha reta) (Figura 3).

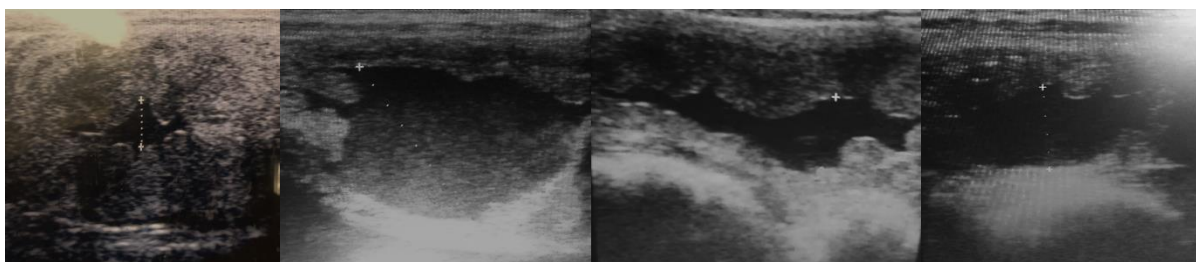
Nos casos em que foi detetado à ecografia um folículo ≥ 35 mm e edema uterino grau 3, aplicou-se um tratamento de indução da ovulação (com hCG ou com um análogo da GnRH) e após 12 a 24 horas, procedeu-se à IA com sémen refrigerado ou cobrição natural. Após 24 horas da IA ou cobrição foi realizada outra monitorização ecográfica para confirmação da ovulação e avaliação das características uterinas, relativamente à presença e quantidade de fluido intrauterino e edema endometrial. Nos casos em que a ovulação não ocorreu, repetiu-se a IA ou o salto.

No caso da IA com sémen congelado, foi necessária uma monitorização ecográfica mais regular, de 4 em 4 horas, de modo ser detetada a ovulação e realizar-se a IA após a mesma. Após 5 horas da IA foi realizado um controlo ecográfico para avaliar as características uterinas. Quando não era possível cumprir este horário, por questões de logística, a ecografia era realizada até às 24 horas pós-IA.

O protocolo terapêutico foi independente do tipo de método reprodutivo e de sémen utilizado. Este foi realizado nas éguas que apresentaram sinais indicativos de endometrite antes ou após a IA ou cobrição, com uma imagem ecográfica compatível com a presença de um conteúdo intrauterino hipoecogénico e um edema endometrial excessivo, sendo a opção do tratamento efetuada pelo clínico, tendo em consideração a história reprodutiva de cada égua e o sucesso de tratamentos previamente aplicados. O protocolo terapêutico foi executado entre as 5 e as 72 horas pós-IA ou cobrição e consistiu na realização de lavagens uterinas e na administração única ou repetida de 25 UI de ocitocina IM a todas as éguas que apresentaram fluido intrauterino à ecografia. O protocolo terapêutico adicional consistiu na administração de fármacos corticosteroides nos casos de maior grau de inflamação, aplicação tópica de misoprostol ao nível do cérvix e administração intrauterina e sistémica de antibióticos. Nas éguas submetidas a tratamento foram realizadas ecografias diárias de seguimento até à resolução da endometrite ou, no máximo, até às 72 horas após a IA ou cobrição.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ecografia transretal após 15 dias da confirmação da ovulação.

Figura 3 - Ecografias transretais em que é possível a visualização e medição da quantidade de fluido uterino presente. Fotografia obtidas através da câmara do telemóvel (16 Megapixels) (Original)



2.4. Lavagem uterina

Foram realizadas lavagens uterinas, como meio de tratamento e de diagnóstico, a todas as éguas que apresentaram fluido uterino à ecografia (pré ou pós-IA ou cobrição) e/ou edema endometrial excessivo pós-IA ou cobrição.

Antes da realização deste procedimento foi executada a limpeza da região perineal. A cauda foi amarrada e a área perineal foi lavada com água e eventualmente com uma solução aquosa de iodopovidona a 7,5%, no caso de se encontrar muito conspurcada, seguida da secagem com papel descartável. A técnica da lavagem uterina foi realizada por três operadores diferentes, seguindo sempre o mesmo procedimento. Este consistiu na infusão intrauterina de 1 L de uma solução estéril de LR (Braun Vet, Ref:26/449282/0112). Esta solução foi introduzida no útero através de uma sonda estéril de lavagem uterina (Kruuse Equivet, Ref: 340835), sendo o fluido posteriormente removido do útero por gravidade para a garrafa de LR. Antes de se retirar a sonda de lavagem do útero, esta foi desacoplado da garrafa de LR, de modo a não conspurcar a solução recolhida, assegurando assim que esta constitui uma amostra exclusivamente uterina. O fluido foi avaliado imediatamente quanto à sua transparência, sendo que nos casos em que não se apresentou limpo, a lavagem foi repetida, sendo utilizado mais do que 1 L de LR.

As garrafas de LR foram identificadas com o nome da égua, a data e a hora da lavagem. O registo das lavagens foi dividido entre lavagens pré e lavagens pós-IA ou cobrição, sendo que para este estudo apenas foi incluída uma única lavagem por égua antes da IA ou cobrição (Grupo 3) e a primeira lavagem do ciclo realizada às 24 horas pós-IA ou cobrição (Grupo 2), tendo sido excluídas deste grupo todas as éguas que foram sujeitas a uma lavagem uterina anterior.

Figura 4 - Procedimento da lavagem uterina e exemplo de fluidos uterinos recolhidos por meio desta técnica (Original)



Legenda: A - Procedimento de lavagem uterina

B – Garrafas de LR contendo o fluido uterino recuperado da lavagem uterina realizada em A, ordenadas da esquerda (primeira) para a direita (última)

C e D – Exemplos de fluídos resultantes de lavagens uterinas realizadas, ordenados da esquerda (primeiro) para a direita (último)

2.5. Citologia endometrial

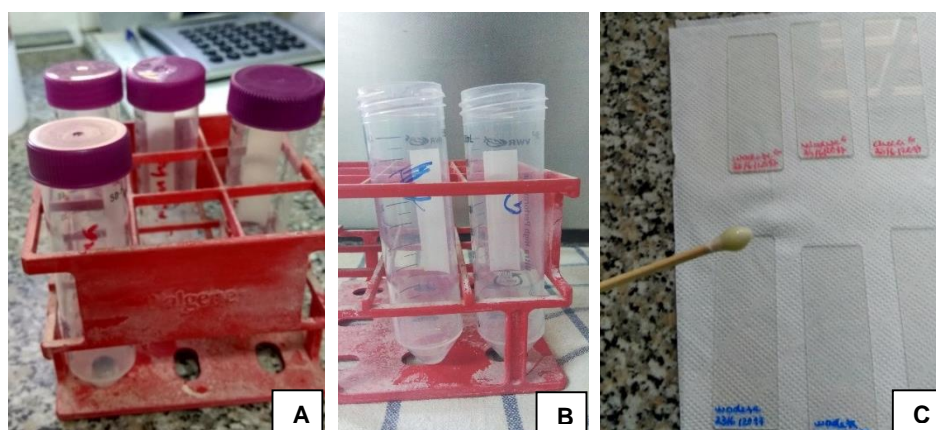
Foram realizadas citologias endometriais a partir de 44 lavagens uterinas (34 do Grupo 2 e 10 do Grupo 3), tendo sido aproveitado o fluido do primeiro litro de LR.

As soluções de lavagem foram mantidas à temperatura ambiente e dentro de 24 horas foi realizado o seguinte protocolo, após homogeneização das soluções:

- Com um algodão embebido em álcool foi desinfetada uma zona superior da garrafa de LR, que não esteve em contato com superfícies sujas. Seguidamente, foi realizado um corte nesta região com uma tesoura (previamente desinfetada com álcool) e foi transferido um volume de 50 mL deste fluido para um tubo cônico esterilizado (Figura 3, A e B). De seguida, o tubo foi observado à luz e foi realizada uma avaliação e registo da transparência e quantidade de muco presente em transparente, turvo ou transparente com fios de muco. Seguidamente este fluido foi centrifugado durante 10 minutos a 448 g, utilizando uma centrífuga Nahita (Modelo

2740, Ref:52740000). O sobrenadante foi imediatamente eliminado e foi utilizada uma zaragatoa esterilizada que foi rodada no pellet. De seguida, foram realizados dois esfregaços através da zaragatoa na lâmina em três linhas. Foram utilizadas duas lâminas de microscópio para cada lavagem, previamente desinfetadas com álcool a 96º e identificadas com o nome da égua, a data da lavagem e a coloração utilizada (Figura 3 - C). Foram realizadas duas colorações, a coloração Diff-Quik, para avaliação do grau de inflamação e a coloração de Gram, para avaliação da presença de bactérias e classificação das mesmas em Gram-positivas e Gram-negativas.

Figura 5 - Procedimento da realização de esfregaços para citologia (Original)



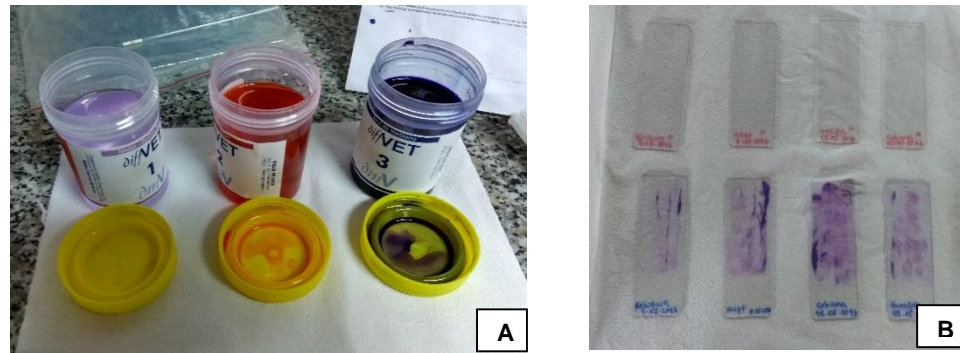
Legenda: A e B – Tubos cónicos (50 mL) que contêm o fluido uterino centrifugado

C – Realização de esfregaços através da zaragatoa nas lâminas previamente identificadas

2.5.1. Coloração Diff-Quik

Um dos esfregaços obtidos foi fixado por secagem ao ar e posteriormente corado no laboratório do Centro com uma coloração do tipo Romanowsky, o Diff-Quik (Diff-vet, dmv, Ref:907-1078). A coloração Diff-Quik consiste em três reagentes: o primeiro é um fixador metalónico (solução de metanol), o segundo é um corante ácido, a eosina e o terceiro é um corante básico, o azul de metileno. Foi realizado o mesmo protocolo de coloração para todos os esfregaços: primeiro a lâmina foi fixada na solução de metanol e de seguida foi corada com os corantes diluídos numa solução aquosa em tampão fosfato. O procedimento consistiu em mergulhar a lâmina 5 vezes (1 segundo) em cada uma destas soluções, tendo sido escorrido o excesso de solução entre elas. No final a lâmina foi lavada com água corrente da torneira, deixada secar ao ar e guardada numa caixa de transporte de lâminas.

Figura 6 – Procedimento da realização da Coloração Diff-Quik (Original)



Legenda: A – Coloração Diff-vet®

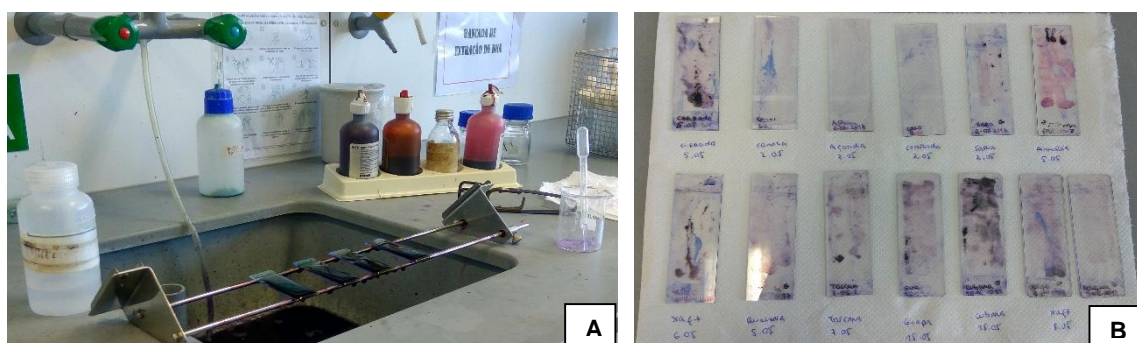
B – 4 lâminas (fila inferior) coradas com a coloração Diff-Quik

2.5.2. Coloração de Gram

O outro esfregaço obtido da lavagem uterina foi fixado pelo calor, com recurso a um isqueiro e guardado numa caixa de transporte de lâminas, ao abrigo da luz e do pó. O restante protocolo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, onde se procedeu à coloração de Gram do esfregaço (Ref do kit da coloração Gram:1.118895.0001), realizada segundo o protocolo do laboratório:

- Corar o esfregaço com cristal violeta durante 2 minutos, deixar escorrer o corante e lavar com água corrente da torneira. Posteriormente cobrir a lâmina com o mordente (solução de lugol) durante 60 segundos; lavar com água e diferenciar com 3 a 5 gotas de álcool-acetona; lavar com água e contrastar com safranina durante 15 segundos; lavar com água e enxugar.

Figura 7 - Procedimento da realização da coloração Gram (Original)



Legenda: A – Realização da coloração Gram

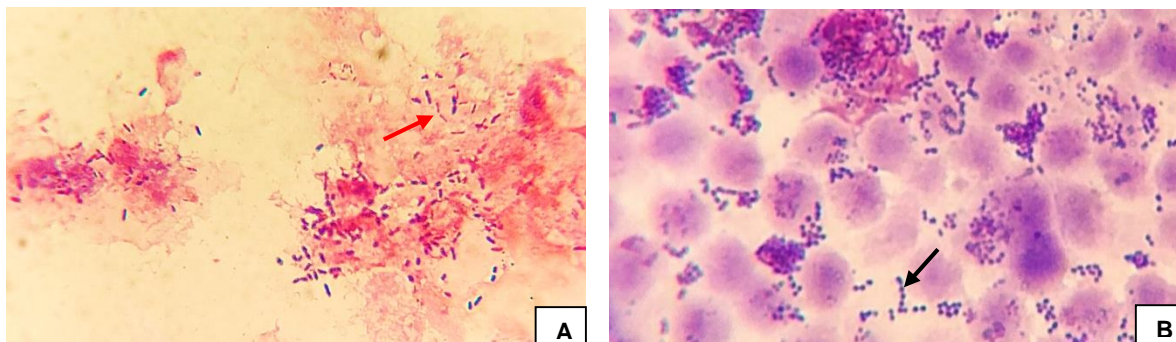
B – Lâminas coradas com a coloração Gram

2.5.3. Avaliação citológica

A avaliação citológica dos esfregaços corados com a coloração de Gram foi realizada no Laboratório de Bacteriologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

As lâminas foram observadas ao microscópio ótico (Olympus, modelo CH30, Ref:200) numa ampliação de 1000x (objetiva de óleo de imersão) e foram contabilizadas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em HPF e registada a sua forma e arranjo.

Figura 8 – Fotografias dos esfregaços de fluido uterino previamente corados com coloração Gram, obtidas através da câmara do telemóvel (16 Megapixels). Ampliação 1000x (Original)



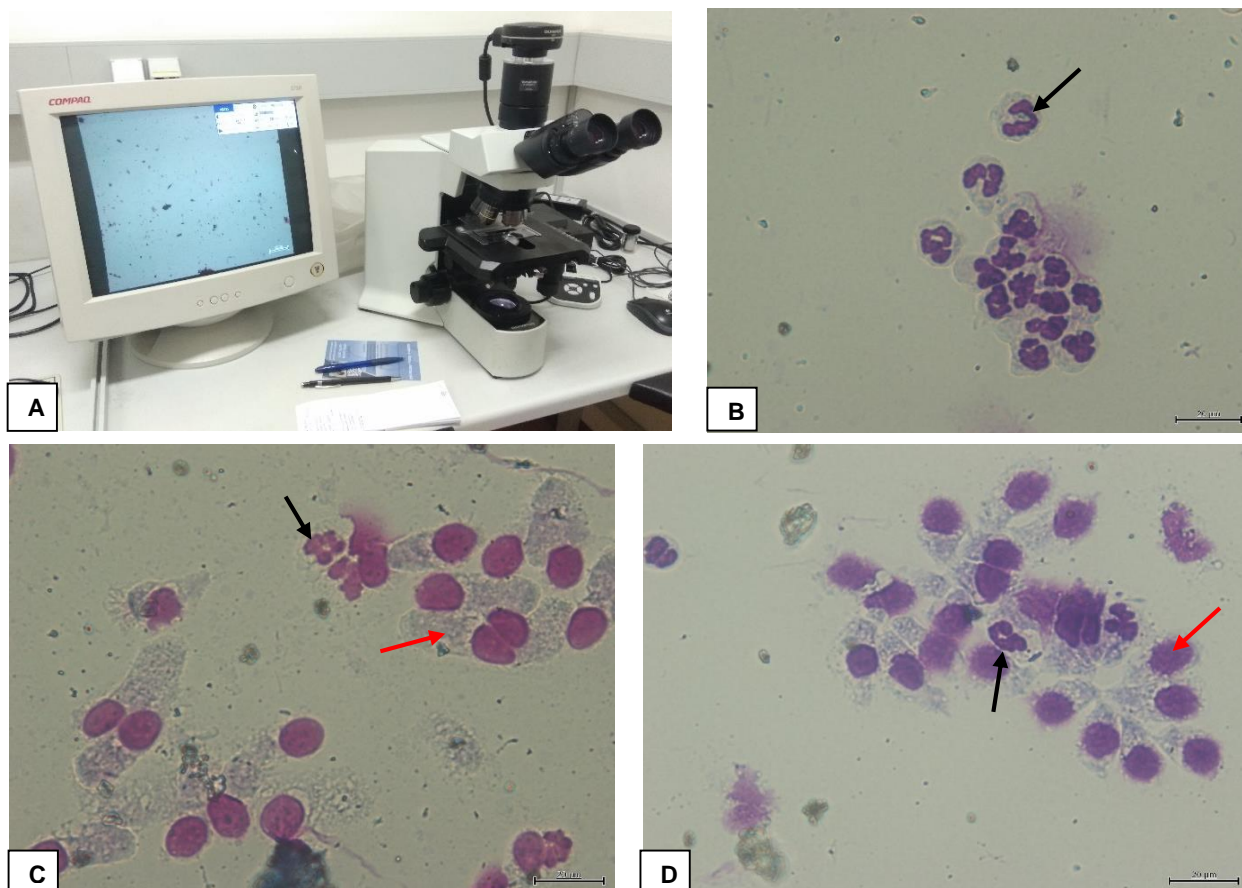
Legenda: **A** – Observação de bacilos Gram-negativos (seta vermelha)
B – Observação de cocos Gram-positivos (seta preta)

As lâminas coradas com a coloração Diff-Quik foram inicialmente observadas ao microscópio ótico numa ampliação pequena (100x) de modo a ser avaliada a qualidade do esfregaço através da observação do conteúdo do fundo do mesmo e das células fragmentadas e distorcidas, bem como a quantidade de detritos presentes. Foi feito um registo fotográfico das lâminas coradas com Diff-Quik no Departamento de Anatomia Patológica, numa ampliação de 400x a 10 campos HPF de cada lâmina, através de uma câmara digital Olympus DP21 acoplada ao microscópio ótico Olympus BX-51. Posteriormente, foi realizada a contagem do número de PMN e das células endometriais a partir das fotografias analisadas no programa de contagem ImageJ 1.50i e foi registada a percentagem de PMN em relação às células do endométrio. Foi ainda assinalada a presença de outras células como eritrócitos, eosinófilos, linfócitos e a eventual presença de cristais urinários, bactérias e fungos. A partir da análise das percentagens de PMN presentes, foi realizada a classificação citológica das amostras (Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Riddle et al., 2007), como indicado na tabela 5.

Tabela 5 - Classificação do grau de inflamação consoante a percentagem de PMN em relação às células endometriais

Sem inflamação: PMN <5%
Inflamação ligeira: PMN 5-15%
Inflamação moderada: PMN 15-30%
Inflamação grave: PMN > 30%

Figura 9 - Avaliação citológica dos esfregaços corados pela coloração Diff-Quik (Original)



Legenda: **A:** Câmara digital acoplada ao microscópio ótico, utilizada para registo fotográfico das lâminas

B, C e D – Fotografias dos esfregaços de fluido uterino previamente corados com coloração Diff-Quik, obtidas através do equipamento representado em A, na ampliação 400x. É possível a observação de células endometriais (setas vermelhas) e PMN (setas pretas)

2.6. Análise estatística

Todos os dados recolhidos ao longo deste estudo foram registados e organizados em tabelas no programa Excel do Microsoft Office (versão 2013), para posterior análise estatística. Os dados foram analisados no programa R, versão 3.4.1. para o Windows, com a extensão *R commander* (Rcmdr). Este programa permitiu uma análise estatística inferencial e descritiva e a realização de gráficos.

Para verificar a existência de uma correlação estatística foram realizados vários testes e considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. As amostras qualitativas categóricas foram analisadas através do teste exato de Fisher, em tabelas de contingência 2 x 2. Para analisar as variáveis quantitativas foi necessário verificar a sua distribuição através do teste Shapiro-Wilk, sendo que para uma distribuição normal o valor de $p > 0,05$. Para as variáveis que não apresentaram uma distribuição normal ($p < 0,05$) foi realizado um teste não paramétrico, o teste de Wilcoxon. Para as variáveis que apresentaram uma distribuição normal ($p > 0,05$) foi realizado um teste paramétrico, o teste t de Welch.

3. RESULTADOS

3.1. Grupo 1 (Geral)

O estudo com recurso à análise estatística permitiu concluir que as variáveis que influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a presença de fluido uterino foram: a idade da égua, o tipo de reprodução e a repetição da IA ou salto. Foi observado que o tipo de sêmen apresentou uma tendência para a significância ($p < 0,1$). Foi ainda verificada uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre a presença de fluido uterino e o resultado do diagnóstico de gestação. Não foi observada nenhuma correlação entre o resultado do diagnóstico de gestação e a idade (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de significância estatística de p value para cada variável analisada

Associação entre a presença de fluido uterino e:	p value
Idade	$p \approx 0^a$
Tipo de reprodução	$p \approx 0^b$
Tipo de sêmen	$p = 0,099^b$
Repetição da IA ou salto	$p \approx 0^b$
Associação entre o diagnóstico de gestação e:	p value
Presença de fluido uterino	$p = 0,048^b$
Idade	$p = 0,315^a$

a. Valores obtidos pelo teste de Wilcoxon

b. Valores obtidos pelo teste exato de Fisher

3.1.1. Caracterização dos parâmetros avaliados

Relativamente à presença de fluido uterino, foi observado que 119 éguas (63,98%) não apresentaram fluido intrauterino à ecografia, ao contrário das restantes 67 éguas (36,02%) que mostraram sinais ecográficos compatíveis com a sua presença.

Em relação ao resultado do diagnóstico de gestação, 96 éguas (51,61%) ficaram gestantes, ao contrário das restantes 90 éguas (48,39%) que apresentaram um resultado de diagnóstico de gestação negativo no ciclo avaliado. No final da época reprodutiva obteve-se uma taxa de gestação positiva de 77,96% ($n=145$) e uma taxa de gestação negativa de 22,04% ($n=41$).

Em seguida apresentam-se as análises estatísticas e os gráficos referentes às diferentes variáveis avaliadas em relação a estes dois parâmetros.

3.1.2. Idade

Verificou-se uma discrepância na idade das éguas em relação à presença de fluido intrauterino, sendo observado que a média das idades das éguas que apresentaram fluido uterino (média=13 anos) é superior à média das idades daquelas que não exibiram fluido uterino à ecografia (média=9 anos). Como se pode observar no gráfico 1, a maior parte das

éguas que não apresentaram fluido uterino têm idades compreendidas entre os 5 e os 12 anos, sendo a mediana 8 anos. A maioria das éguas que apresentaram fluido uterino à ecografia possuem uma idade entre os 9 e os 17 anos, sendo a mediana 11 anos de idade. Foi verificado que existe significância estatística entre a idade e a presença de fluido uterino ($p \approx 0$).

Através da análise do gráfico 2, foi possível observar que não existiram diferenças relevantes nas idades das éguas em relação ao resultado do diagnóstico de gestação, verificando-se que a média das idades das éguas que ficaram gestantes (média=10 anos) é semelhante à média das idades das não gestantes (média=11 anos). A maior parte das éguas que não ficaram gestantes têm idades compreendidas entre os 6 e os 15 anos, sendo a mediana 10 anos. A maioria das éguas que ficaram gestantes possuem uma idade entre os 6 e os 14 anos, sendo a mediana 10 anos de idade. Não foi encontrada uma significância estatística entre a idade e o resultado do diagnóstico de gestação ($p=0,315$).

Gráfico 1 - Gráfico Boxplot comparativo entre as idades das éguas e a presença de fluido intrauterino à ecografia

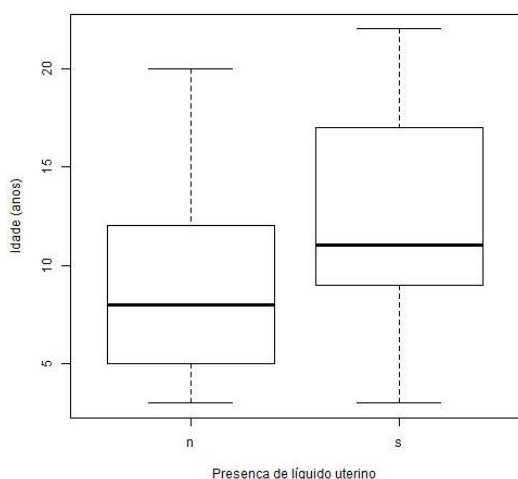
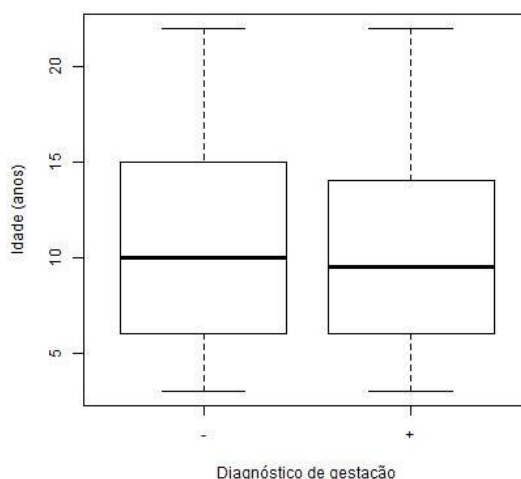


Gráfico 2 - Gráfico Boxplot comparativo entre as idades das éguas e o resultado do diagnóstico de gestação



3.1.3. Tipo de reprodução (IA ou salto)

Como pode ser observado na tabela 7, ao longo desta época reprodutiva foi realizada IA em 139 éguas e 47 éguas foram submetidas à cobertura natural. Das éguas inseminadas, 43,9% ($n=61$) apresentaram fluido uterino à ecografia e este foi observado em 12,8% ($n=6$) das éguas sujeitas à cobertura natural. Foi concluído que o tipo de reprodução influenciou significativamente ($p \approx 0$) a presença de fluido uterino à ecografia, sendo observado que a incidência de fluido uterino foi superior nas éguas submetidas a IA.

Tabela 7 - Frequências absolutas e relativas da presença de fluido uterino à ecografia, em relação ao tipo de reprodução (IA ou cobrição natural)

Fluido uterino à ecografia			
Tipo de reprodução	NÃO	SIM	TOTAL
IA	78 (56,1%)	61 (43,9%)	139
Cobrição natural (salto)	41 (87,2%)	6 (12,8%)	47
TOTAL	119	67	186

3.1.4. Tipo de sémen

Como resumido na tabela 8, foi realizada IA a 139 éguas, das quais 108 foram inseminadas com sémen refrigerado e 31 com sémen congelado. A variável tipo de sémen apresentou uma tendência para a significância ($p=0,099$), sendo a presença de fluido uterino superior nas éguas inseminadas com sémen congelado (58,1%).

Tabela 8 - Frequências absolutas e relativas da presença de fluido uterino à ecografia, em relação ao tipo de semen utilizado (refrigerado e congelado)

Fluido uterino à ecografia			
Tipo de sémen	NÃO	SIM	TOTAL
Refrigerado	65 (60,2%)	43 (39,8%)	108
Congelado	13 (41,9%)	18 (58,1%)	31
TOTAL	78	61	139

3.1.5. Repetição da IA ou salto

Como resumido na tabela 9, foi registado que do total das 186 éguas acompanhadas durante a época reprodutiva, foi repetida a IA ou cobrição natural em 13, após verificação da não ocorrência de ovulação. Como observado na tabela 12, destas 13 éguas, 84,6% ($n=11$) apresentaram fluido uterino à ecografia. Das restantes éguas, não submetidas a nova IA ou salto ($n=173$), somente em 32,4% ($n=56$) foi observado fluido uterino à ecografia. Verificou-se que a repetição da IA ou do salto influenciou muito significativamente ($p\approx 0$) e positivamente a presença de fluido uterino à ecografia.

Tabela 9 - Frequências absolutas e relativas da presença de fluido uterino à ecografia, em relação à repetição da IA ou salto

Fluido uterino à ecografia			
Repetição da IA ou salto	NÃO	SIM	TOTAL
NÃO	117 (67,6%)	56 (32,4%)	173
SIM	2 (15,4%)	11 (84,6%)	13
TOTAL	119	67	186

3.1.6. Presença de fluido uterino

Como resumido na tabela 10, das 119 éguas que não apresentaram fluido uterino à ecografia foi verificado que 42,9% (n=51) não ficaram gestantes nesse ciclo. Das 67 éguas em que foi observado fluido uterino, 58,2% (n=39) apresentaram um resultado de diagnóstico de gestação negativo nesse ciclo. A presença de fluido uterino à ecografia influenciou significativamente ($p=0,048$) o resultado do diagnóstico de gestação, tendo sido observado que o diagnóstico de gestação positivo está mais relacionado com a ausência de fluido uterino.

Tabela 10 - Frequências absolutas e relativas do diagnóstico de gestação, em relação à presença de fluido uterino à ecografia

Fluido uterino à ecografia	Diagnóstico de gestação		TOTAL
	-	+	
NÃO	51 (42,9%)	68 (57,1%)	119
SIM	39 (58,2%)	28 (41,8%)	67
TOTAL	90	96	186

3.2. Grupo 2 (Pós-IA ou cobertura)

O estudo com recurso à análise estatística permitiu concluir que existe uma relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a presença de linfócitos e a inflamação uterina e entre a repetição das lavagens e o resultado do diagnóstico de gestação. As restantes variáveis analisadas não apresentaram significância estatística (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de significância estatística de p value para cada variável analisada

Associação entre a inflamação uterina e:	p value
Fluido uterino (cm)	$p=0,210^a$
Presença de bactérias	$p=0,128^a$
Presença de linfócitos	$p \approx 0^a$
Associação entre a presença de fluido uterino e:	p value
Presença de bactérias	$p=0,220^a$
Associação entre a presença de bactérias e:	p value
Presença de linfócitos	$p=1^b$
Associação entre o diagnóstico de gestação e:	p value
Repetição das lavagens	$p=0,008^b$
Grau de inflamação	$p=0,262^a$
Tratamento	$p=0,105^b$

a. Valores obtidos pelo teste de Wilcoxon

b. Valores obtidos pelo teste exato de Fisher

3.2.1. Caracterização dos parâmetros avaliados

Relativamente à presença de inflamação, das 34 éguas avaliadas pós-IA ou cobrição, 9 (26,47%) não apresentaram inflamação uterina, 4 (11,76%) tinham inflamação ligeira, 2 (5,88%) apresentaram inflamação moderada e 19 (55,88%) apresentaram inflamação grave. Quanto à presença de fluido uterino, apenas duas éguas não apresentaram fluido uterino à ecografia, sendo que este foi observado nas restantes 32 éguas e verificou-se que a média do fluido foi 1,69 cm.

Em relação à presença de bactérias, não foram encontradas bactérias na citologia em 21 éguas (61,76%). Nas restantes 13 éguas (38,24%) foi observada a presença de bactérias, das quais 8 apresentaram cocos Gram-positivos, 3 apresentaram bacilos Gram-positivos, 1 égua apresentou bacilos Gram-negativos e ocorreu uma infeção mista (com bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos) em apenas 1 égua.

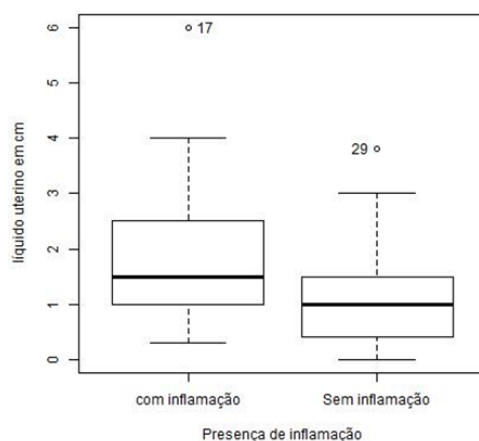
No que respeita o resultado do diagnóstico de gestação, 16 éguas (47,06%) ficaram gestantes, ao contrário das restantes 18 éguas (52,94%) que apresentaram um resultado de diagnóstico de gestação negativo no ciclo avaliado.

Em seguida apresentam-se as análises estatísticas e os gráficos referentes às diferentes variáveis avaliadas em relação a estes quatro parâmetros.

3.2.2. Presença e quantidade de fluido uterino

Foi possível verificar uma discrepância nas medições de fluido uterino em relação à presença de endometrite, sendo que a média do fluido uterino medido à ecografia das éguas que apresentaram inflamação (média=1,83 cm) é superior à média do fluido das que não apresentaram inflamação (média=1,30 cm). Como se pode observar no gráfico 3, a maior parte das éguas com inflamação apresentam fluido uterino com medidas compreendidas entre os 1 cm e os 2,5 cm, sendo a mediana 1,5 cm. A maioria das éguas que não apresentaram endometrite possuem fluido uterino com medidas compreendidas entre os 0,4 cm e 1,5 cm, sendo a mediana 1 cm. No entanto, não existe significância estatística entre o fluido intrauterino medido em cm e a presença de inflamação ($p=0,210$). Através de uma análise descritiva dos resultados obtidos, foi possível verificar que das 9 éguas que não tinham endometrite, 2 não apresentaram fluido uterino à ecografia. Contudo, as restantes 7 éguas apresentaram medições de fluido uterino muito discrepantes, mas em apenas 2 éguas foi observado mais do que 2 cm de fluido à ecografia. Pelo contrário, todas as restantes éguas com mais de 2 cm de fluido à avaliação ecográfica tinham endometrite grave. Das 19 éguas com endometrite grave, 11 apresentaram medidas de fluido uterino à ecografia inferiores a 2 cm.

Gráfico 3 - Gráfico Boxplot comparativo entre o fluido uterino medido em cm e a presença de inflamação uterina



3.2.3. Presença de bactérias

Através da análise do gráfico 4, foi possível verificar que não existem diferenças relevantes na quantidade de fluido uterino em relação à presença de bactérias, dado que a média do fluido uterino medido à ecografia das éguas que apresentaram bactérias (média=1,96cm) não foi muito diferente da média do fluido uterino das éguas que não tinham bactérias (média=1,52cm). A maior parte das éguas em que foram observadas bactérias na citologia, tinham medidas de fluido uterino entre 1 cm e 2,7 cm, sendo a mediana 1,7 cm. A maior parte das éguas que não tinham bactérias na citologia, apresentaram medidas de fluido uterino compreendidas entre 0,8 cm e 1,6 cm, sendo a mediana 1,3 cm. Foi verificado que estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0,220$).

Foi possível verificar uma discrepância entre a percentagem de PMN em relação à presença de bactérias, sendo que a média da percentagem de PMN das lavagens uterinas em que se verificou a presença de bactérias (média=53,76%) é superior à média das éguas em que não foram observadas bactérias (média=36,02%), como se pode observar no gráfico 5. A correlação entre estas duas variáveis não foi estatisticamente significativa ($p=0,128$).

Através de uma análise descritiva dos resultados obtidos, foi possível verificar que das 13 éguas infetadas todas apresentaram fluido uterino e que 9 tinham uma inflamação grave, 1 égua tinha uma inflamação moderada, 2 tinham uma inflamação ligeira e somente 1 égua não apresentou endometrite. Verificou-se uma infeção mista em apenas 1 égua, que apresentou uma inflamação grave.

Gráfico 4 - Gráfico Boxplot comparativo entre o fluido uterino medido em cm e a presença de bactérias

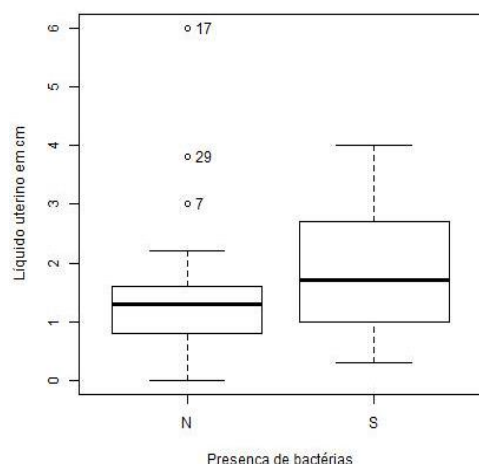
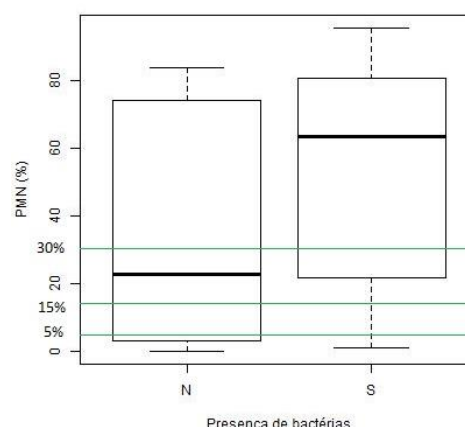


Gráfico 5 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de bactérias



Legenda: As linhas horizontais verdes correspondem aos limites das percentagens de PMN entre os vários graus de inflamação (sem inflamação: 0 a 5%; inflamação ligeira: 5 a 15%; inflamação moderada: 15 a 30% e inflamação grave: >30%)

3.2.4. Presença de linfócitos

No que diz respeito à presença de linfócitos, estes foram observados em 12 éguas (35,29%).

Nas restantes 22 éguas (64,71%) não foram observados linfócitos na citologia.

Como se pode observar na tabela 12, 5 éguas apresentaram linfócitos e bactérias, 14 éguas não apresentaram nenhum tipo de célula, em 8 éguas foram encontradas apenas bactérias e nas restantes 7 éguas só foram encontrados linfócitos. Não foi detetada uma associação estatisticamente significativa ($p=1$) entre as duas populações celulares.

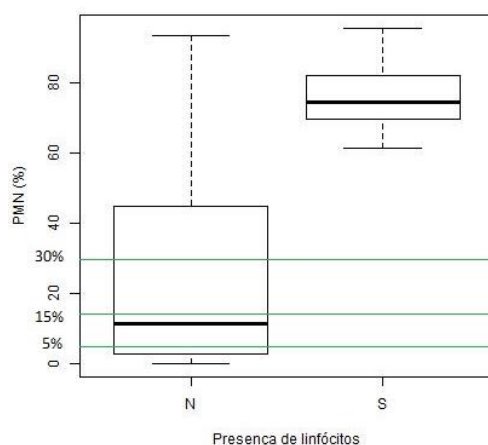
Foi possível verificar uma discrepância entre a percentagem de PMN em relação à presença de linfócitos, sendo que a média da percentagem de PMN das lavagens uterinas em que se verificou a presença de linfócitos (média=75,90%) é superior à média das éguas em que não foram observados linfócitos (média=24,7%), como se pode observar no gráfico 6. Verifica-se que apenas foram encontrados linfócitos nas éguas que possuem uma inflamação uterina grave (>30%). O grau da inflamação uterina influenciou muito significativamente ($p\approx 0$) a presença de linfócitos.

Através de uma análise descritiva dos resultados obtidos, foi possível verificar que das 9 éguas infetadas e com endometrite grave, 5 apresentaram linfócitos na citologia.

Tabela 12 - Frequências absolutas e relativas da presença de linfócitos, em relação à presença de bactérias

Presença de bactérias			
Presença de Linfócitos	NÃO	SIM	TOTAL
NÃO	14 (63,6%)	8 (36,4%)	22
SIM	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12
TOTAL	21	13	34

Gráfico 6 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de linfócitos



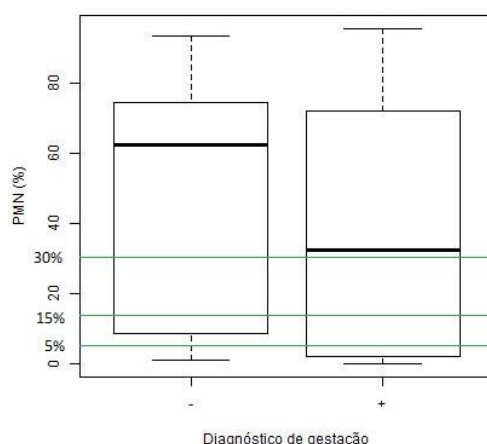
Legenda: As linhas horizontais verdes correspondem aos limites das percentagens de PMN entre os vários graus de inflamação (sem inflamação: 0 a 5%; inflamação ligeira: 5 a 15%; inflamação moderada: 15 a 30% e inflamação grave: >30%)

3.2.5. Grau de inflamação

Existem diferenças entre o grau de inflamação e o resultado do diagnóstico de gestação, dado que a média da percentagem de PMN das lavagens uterinas em que se verificou um diagnóstico de gestação positivo (média= 36,86%) é inferior à média das éguas que não ficaram gestantes (média= 48,08%), Como se pode observar no gráfico 7. No entanto, as diferenças observadas não são estatisticamente significativas ($p=0,262$).

Através de uma análise descritiva dos resultados obtidos, foi possível verificar que das 9 éguas sem endometrite, 6 ficaram gestantes. Das 25 éguas com endometrite, foi observado um diagnóstico de gestação positivo em 10 éguas. De facto, das 4 éguas que tinham inflamação ligeira, apenas 1 ficou gestante; das 2 éguas com inflamação moderada, 1 ficou gestante e das 19 éguas com endometrite grave, 8 apresentaram um diagnóstico de gestação positivo.

Gráfico 7 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e o resultado do diagnóstico de gestação.



Legenda: As linhas horizontais verdes aos limites das percentagens de PMN entre os vários graus de inflamação (sem inflamação: 0 a 5%; inflamação ligeira: 5 a 15%; inflamação moderada: 15 a 30% e inflamação grave: >30%)

3.2.6. Repetição das lavagens uterinas

Como resumido na tabela 13, foi realizada mais do que uma lavagem uterina por ciclo em 10 éguas, sendo que 90% dessas éguas (n=9) não ficaram gestantes. Nas restantes éguas analisadas (n=24) foi apenas realizada uma única lavagem uterina por ciclo, verificando-se que 37,5% (n=9) apresentaram um diagnóstico de gestação negativo. A necessidade da repetição das lavagens uterinas influenciou significativamente ($p=0,008$) e negativamente o resultado do diagnóstico de gestação, sendo observado que o diagnóstico de gestação positivo está mais relacionado com a realização de uma única lavagem uterina.

Através de uma análise descritiva dos dados relativos às citologias das lavagens uterinas repetidas, foi possível verificar que 9 éguas apresentaram endometrite grave, das quais 4 tinham bactérias e somente 1 égua apresentou endometrite moderada e bactérias. Conclui-se ainda que, após a repetição da lavagem uterina, ocorreu uma melhoria do grau da inflamação em 6 éguas e um aumento do mesmo em 2 éguas, sendo que nas restantes éguas o grau da inflamação manteve-se igual. Foi ainda possível observar um aparecimento de bactérias após lavagens uterinas repetidas em 3 éguas e um desaparecimento deste micorganismo em 3 éguas.

Tabela 13 - Frequências absolutas e relativas do diagnóstico de gestação, em relação à repetição da lavagem uterina nesse ciclo

Repetição lavagem uterina	Diagnóstico de gestação		TOTAL
	-	+	
NÃO	9 (37,5%)	15 (62,5%)	24
SIM	9 (90%)	1 (10%)	10
TOTAL	18	16	34

3.2.7. Tratamento adicional

Como se pode observar na tabela 14, foi realizado tratamento adicional a 4 éguas que tinham inflamação uterina grave e nenhuma ficou gestante. As restantes 30 éguas não foram sujeitas a tratamento adicional, verificando-se um diagnóstico de gestação positivo em 53,3% (n=16). Contudo, estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0,105$).

Através de uma análise descritiva dos dados, foi possível verificar que 3 das éguas submetidas a tratamento adicional foram também sujeitas a lavagens uterinas repetidas e apenas 1 dessas éguas não apresentou bactérias na citologia.

Tabela 14 - Frequências absolutas e relativas do diagnóstico de gestação, em relação à realização de tratamento adicional

Diagnóstico de gestação			
Tratamento adicional	-	+	TOTAL
NÃO	14 (46,7%)	16 (53,3%)	30
SIM	4 (100%)	0 (0%)	4
TOTAL	18	16	34

3.3. Grupo 3 (Pré-IA ou cobrição)

O estudo com recurso à análise estatística permitiu concluir que a presença de bactérias em relação à inflamação uterina foi a única variável analisada que mostrou significância estatística ($p>0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores de significância estatística de p value para cada variável analisada

Associação entre a inflamação uterina e:	p value
Fluido uterino (cm)	$p=0,611^a$
Presença de bactérias	$p=0,033^b$
Presença de linfócitos	$p=0,171^b$
Associação entre a presença de fluido uterino e:	p value
Presença de bactérias	$p=0,700^a$
Associação entre a presença de bactérias e:	p value
Presença de linfócitos	$p=1^c$

a. Valor obtido pelo teste de t de Welch

b. Valores obtidos pelo teste de Wilcoxon

c. Valores obtidos pelo teste exato de Fisher

3.3.1. Caracterização dos parâmetros avaliados

Relativamente à presença de inflamação, das 10 éguas avaliadas, 6 éguas (60%) não apresentaram inflamação uterina e 4 éguas (40%) apresentaram inflamação grave.

Quanto à presença de fluido uterino, todas as éguas deste grupo apresentaram fluido uterino à ecografia e verificou-se que a média do fluido foi 1,76 cm.

Em relação à presença de bactérias, das 10 éguas avaliadas, em 7 éguas (70%) não foram encontradas bactérias na citologia. Nas restantes 3 éguas (30%) foi observada a presença de bactérias, das quais 1 apresentou cocos Gram-positivos, 1 tinha bacilos Gram-positivos e ocorreu uma infecção mista em apenas 1 égua.

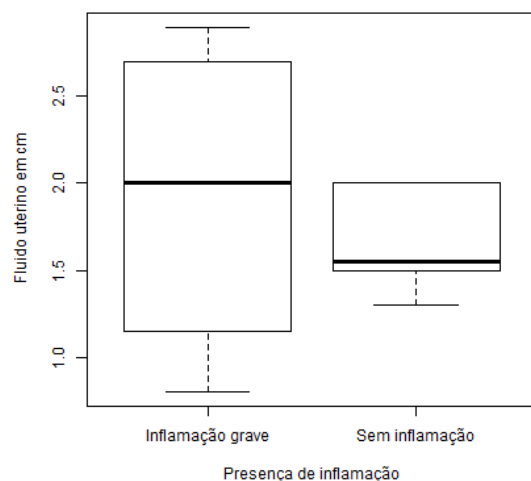
Em seguida apresentam-se as análises estatísticas e os gráficos referentes às diferentes variáveis avaliadas em relação a estes três parâmetros.

3.3.2. Presença e quantidade de fluido uterino

Foi possível verificar uma discrepância nas medições de fluido uterino em relação à presença de inflamação uterina, sendo que a média do fluido uterino medido à ecografia das éguas que apresentaram inflamação grave (média=1,9 cm) é superior à média do fluido das que não apresentaram inflamação (média=1,7 cm). Como se pode observar no gráfico 8, a maior parte das éguas com inflamação têm fluido uterino com medidas compreendidas entre os 1,3 cm e os 2,6 cm, sendo a mediana 2 cm. A maioria das éguas que não apresentaram endometrite possuem fluido uterino com medidas compreendidas entre os 1,5 cm e 1,9 cm, sendo a mediana 1,55 cm. No entanto, foi verificado que não existe uma correlação estatisticamente significativa entre o fluido intrauterino e a presença de inflamação ($p=0,611$).

Através de uma análise descritiva dos resultados obtidos, foi possível verificar que todas as éguas que apresentaram mais de 2 cm de fluido à avaliação ecográfica tinham endometrite grave. Contudo, foi observada Inflamação grave em 2 éguas apresentaram medidas de fluido uterino à ecografia inferiores a 2 cm.

Gráfico 8 - Gráfico Boxplot comparativo entre fluido uterino medido em cm e a presença de inflamação uterina



3.3.3. Presença de bactérias

Através da análise do gráfico 9, foi possível verificar que não existem diferenças relevantes na quantidade de fluido uterino em relação à presença de bactérias, dado que a média do fluido uterino medido à ecografia nas éguas que apresentaram bactérias (média=1,60 cm) não

foi muito diferente da média do fluido uterino nas éguas que não tinham bactérias (média=1,83cm). A maior parte das éguas em que foram observadas bactérias na citologia, tinham medidas de fluido uterino entre 1,15 cm e 2 cm, sendo a mediana 1,5 cm. A maior parte das éguas em que se encontraram bactérias na citologia, apresentaram medidas de fluido uterino compreendidas entre 1,50 cm e 2 cm, sendo a mediana 1,6 cm. Foi verificado que estas diferenças não são estatisticamente significativas ($p=0,700$).

Foi possível verificar uma discrepância entre a percentagem de PMN em relação à presença de bactérias, sendo que a média da percentagem de PMN das lavagens uterinas em que se verificou a presença de bactérias (média=63,53%) é superior à média das éguas em que não foram observados bactérias (média=10,25%), como se pode observar no gráfico 10. Foi concluído que as diferenças entre o grau de inflamação e a presença de bactérias são estatisticamente significativas ($p=0,033$).

Através de uma análise descritiva dos resultados obtidos, foi possível verificar que todas as éguas que apresentaram bactérias tinham inflamação uterina grave e somente uma égua apresentou inflamação uterina não acompanhada da presença de bactérias. Verificou-se uma infecção mista em apenas 1 égua, que apresentou uma inflamação grave.

Através de uma análise descritiva dos dados relativos às citologias das lavagens uterinas pós-IA ou cobrição das 7 éguas deste grupo que apresentaram fluido após a IA ou cobrição, foi possível verificar que ocorreu um aumento do grau de inflamação e aparecimento de bactérias em 3 éguas. Somente numa égua, não submetida a tratamento adicional, foi verificada uma melhoria do grau da inflamação e desaparecimento de bactérias.

Gráfico 9 - Gráfico Boxplot comparativo entre fluido uterino medido em cm e a presença de bactérias

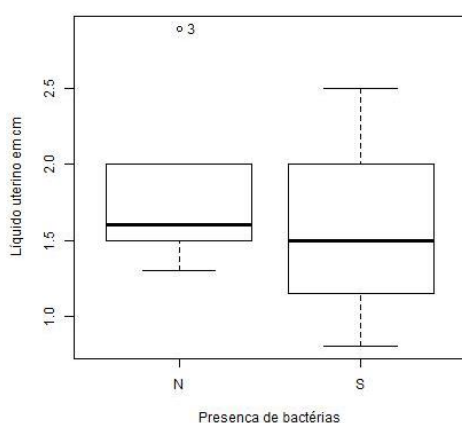
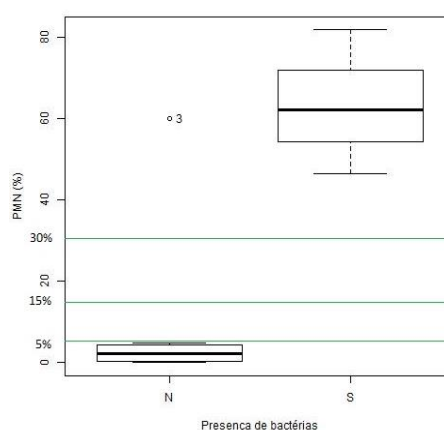


Gráfico 10 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de bactérias



Legenda: As linhas horizontais verdes correspondem aos limites das percentagens de PMN entre os vários graus de inflamação (sem inflamação: 0 a 5%; inflamação ligeira: 5 a 15%; inflamação moderada: 15 a 30% e inflamação grave: >30%)

3.3.4. Presença de linfócitos

Como se pode observar na tabela 16, foram encontrados linfócitos em 4 éguas. Verificou-se que apenas 1 égua apresentou linfócitos e bactérias, 4 éguas não apresentaram nenhum tipo de célula, em 2 éguas foram encontradas exclusivamente bactérias e nas restantes 3 éguas só foram encontrados linfócitos. Não foi detetada uma associação estatisticamente significativa ($p=1$) entre as duas populações celulares.

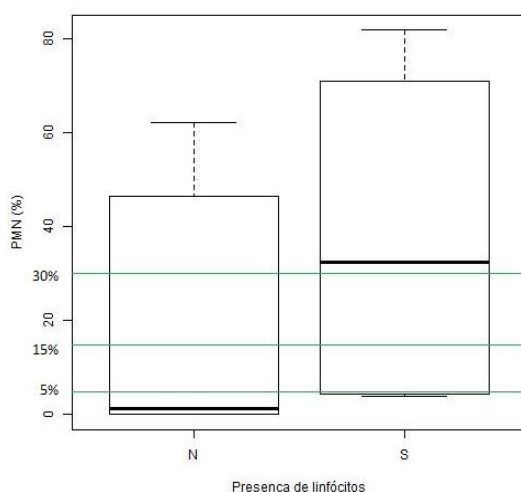
Foi possível verificar uma discrepância entre a percentagem de PMN em relação à presença de linfócitos, sendo que a média da percentagem de PMN das lavagens uterinas em que se verificou a presença de linfócitos (média=37,69%) é superior à média das éguas em que não foram observados linfócitos (média=18,60%), como se pode observar no gráfico 11. Foi verificado que não existe uma correlação estatisticamente significativa entre estes dois parâmetros (0,171).

Através de uma análise descritiva dos resultados obtidos, foi possível verificar que apenas duas das éguas nas quais se observaram linfócitos apresentaram endometrite grave e metade das éguas que apresentaram endometrite grave tinham linfócitos.

Tabela 16 - Frequências absolutas e relativas da presença de linfócitos, em relação à presença de bactérias

Presença de bactérias			
Presença de linfócitos	NÃO	SIM	TOTAL
NÃO	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6
SIM	3 (75%)	1 (25%)	4
TOTAL	7	3	10

Gráfico 11 - Gráfico Boxplot comparativo entre a percentagem de PMN e a presença de linfócitos.



Legenda: As linhas horizontais verdes correspondem aos limites das percentagens de PMN entre os vários graus de inflamação (sem inflamação: 0 a 5%; inflamação ligeira: 5 a 15%; inflamação moderada: 15 a 30% e inflamação grave: >30%)

4. DISCUSSÃO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar e avaliar a abordagem das endometrites num centro de reprodução equina. Dada a observação diária da importância que as endometrites assumem e do seu impacto na fertilidade, surgiu a necessidade de perceber se a presença e quantidade de fluido uterino avaliado ecograficamente é um parâmetro adequado para a indicação da presença e grau da inflamação uterina. Neste centro de reprodução, este parâmetro é utilizado como indicador da inflamação uterina, constatando-se que as éguas que apresentam fluido uterino à ecografia são submetidas a lavagem uterina, de modo a eliminar os produtos inflamatórios eventualmente presentes. Das 186 éguas avaliadas neste estudo, foi verificada a presença de fluido uterino à ecografia em 63,98% (n=119) e as lavagens uterinas efetuadas representaram 12,20% (n=141) das atividades reprodutivas realizadas neste centro ao longo da época reprodutiva de 2017. É notória a incidência de fluido uterino e a importância da lavagem uterina no quadro geral das atividades realizadas, demonstrando ser fundamental no diagnóstico e tratamento de endometrites e, consequentemente, na obtenção de uma boa taxa de gestação global no final da época reprodutiva (77,96%). Adicionalmente, foram estudadas várias variáveis e a sua influência na presença do fluido uterino à ecografia com o objetivo de perceber o impacto de vários fatores neste parâmetro.

Foram criados três grupos para facilitar o estudo dos vários parâmetros. No grupo 1 (n=186) foram avaliados vários parâmetros que afetam a presença de fluido uterino à ecografia. Parte dos animais em estudo foram depois incluídos no grupo 2 (n=34) e 3 (n=10), para aprofundar o estudo da inflamação uterina antes da IA ou cobrição e após a mesma.

Para avaliar o grau de inflamação uterina foram realizadas citologias endometriais a partir de amostras obtidas através de lavagens uterinas, uma vez que a citologia é um método fácil e de rápido diagnóstico da endometrite (Overbeck et al., 2011; Rasmussen et al., 2015). Foi utilizada a técnica de lavagem uterina de grande volume, como descrito por Sikora et al. (2016), como método de obtenção das amostras para posterior avaliação citológica do grau de inflamação, visto que esta foi utilizada como tratamento para todas as éguas que apresentaram fluido uterino à ecografia. Assim sendo, não foi necessário despendir tempo e dinheiro na realização de outras técnicas, uma vez que este trabalho consiste num estudo desenvolvido paralelamente às atividades clínicas de um centro de reprodução com uma casuística elevada. A lavagem uterina constitui um método perfeitamente adequado para recolher amostras para posterior avaliação citológica do grau de inflamação. Adicionalmente, esta técnica possui a vantagem de recolher material de uma maior área da superfície uterina, o que nos dá uma amostra mais representativa (LeBlanc et al., 2007; Nielsen, 2005).

Foram utilizadas as lavagens uterinas realizadas após 24 horas da IA ou cobrição uma vez que, a partir desta altura, a maior parte dos produtos inflamatórios já foram removidos do útero e o ambiente uterino deve estar recuperado (Woodward & Troedsson, 2013). De facto, a

visualização de fluido intrauterino à ecografia, a partir das 18 horas pós-IA ou cobrição é um indicador de uma alteração na depuração uterina e é característico da endometrite (Pycock, 2007b).

Foram excluídas da amostra todas as éguas sujeitas a uma lavagem uterina anterior às 24 horas, pois a própria lavagem pode influenciar o grau de inflamação avaliado citologicamente, devido à irritação mecânica do endométrio que este tratamento provoca, o que contribui para o recrutamento de novos PMN (Leblanc & Causey, 2009). Adicionalmente, existe um risco aumentado de infecção iatrogénica do útero (Cocchia et al., 2012; Ferris et al., 2015; Buczkowska et al., 2014). Por último, os tratamentos eventualmente aplicados não influenciaram a avaliação do fluido de lavagem, pois estes foram realizados posteriormente às lavagens uterinas incluídas neste estudo.

Seguidamente será apresentada uma discussão dos resultados por grupo de amostra.

4.1. Grupo 1 (Geral)

4.1.1. Idade

Neste estudo foi verificado que a idade influenciou muito significativamente a presença de fluido uterino à ecografia. A média das idades das éguas que apresentaram fluido uterino (13 anos) é superior às restantes, verificando-se assim um aumento do número de éguas com fluido uterino com o avançar da idade.

Estes resultados estão de acordo com a bibliografia consultada, que refere ocorrer uma maior acumulação de fluido no útero nas éguas mais velhas, dado que a idade constitui um importante fator predisponente para a suscetibilidade à endometrite persistente (Carnevale & Ginther, 1992; Pycock, 2007b). Esta associação entre a idade e a suscetibilidade à endometrite parece estar relacionada com aparecimento de alterações anatómicas e degenerativas que podem predispor à acumulação de fluido uterino e estabelecimento de endometrite (Leblanc & Causey, 2009; Ricketts & Alonso, 1991). As alterações anatómicas relacionadas com o aumento da idade das éguas incluem o cérvix estreito e alongado, o útero pendular ou outras alterações prejudiciais do trato reprodutivo que podem provocar um atraso na depuração uterina dos fluidos inflamatórios através do cérvix, havendo acumulação de fluido no útero (Pycock, 2009). Em termos de alterações degenerativas, podem ocorrer modificações a nível do miométrio, uma vez que a contractilidade uterina e o tónus uterino parecem estar diminuídos em éguas idosas, defeitos no aparelho mucociliar, degenerescência vascular e linfangiectasia, (LeBlanc, 2008; Pycock, 2009; Woodward, Christoffersen, Campos, Squires & Troedsson, 2012). Adicionalmente, o avançar da idade está associado ao desenvolvimento de endometrose, verificando-se que a biópsia endometrial revela mais células inflamatórias, mais fibrose e menor densidade de glândulas endometriais (Carnevale & Ginther, 1992).

Vários autores indicam que a idade é o fator individual mais limitante da fertilidade (> 13 anos) (Allen, Brown, Wright & Wilsher, 2007; Hemberg, Lundeheim & Einarsson, 2004; Morris & Allen, 2002) e que está associada a uma resposta imunitária sistêmica alterada (Asbury, Halliwell, Foster & Longino, 1980; Mitchell, Liu, Perryman, Stabenfeldt & Hughes, 1982). No entanto, contrariamente ao esperado, a idade não mostrou nenhuma correlação com o resultado do diagnóstico de gestação no primeiro ciclo, verificando-se que a média das idades das éguas que ficaram gestantes é semelhante à média das idades das não gestantes. É possível concluir que o diagnóstico de gestação está correlacionado com muitos fatores para além da idade.

4.1.2. Tipo de reprodução (IA ou salto)

O tipo de reprodução influenciou muito significativamente a presença de fluido uterino à ecografia, tendo sido observado que a sua incidência foi superior nas éguas submetidas a IA. Estes resultados podem ser explicados pelo facto do sémen utilizado na IA não conter plasma seminal, dado que este foi removido aquando do processamento da dose inseminante. Na cobertura natural, pelo contrário, todo o plasma seminal está presente. Este possui uma função benéfica na modelação da inflamação uterina, pois tem um efeito supressivo na ativação do complemento, na quimiotaxia de PMN e na fagocitose, inibindo assim a resposta inflamatória (Pycock, 2007b). Os resultados estão de acordo com as observações realizadas por Troedsson, Loset, Alghamdi, Dahms e Crabo (2001), que constataram uma duração mais curta da endometrite quando o plasma seminal estava incluído na dose inseminante. Num estudo realizado por Fiala, Pimentel, Mattos, Gregory e Mattos (2007), foi concluído que o plasma seminal desempenha ainda uma função importante na depuração uterina, pois possui agentes ocitócitos e contribui para o transporte seletivo do sémen e eliminação dos espermatozoides mortos do útero.

A maior reação inflamatória observada na IA pode também estar associada à preparação das doses inseminantes com diluidor. Efetivamente, vários autores observaram que a infusão de diluidores leva a uma resposta inflamatória mais duradoura e tardia do que a infusão com plasma seminal e diluidor ou plasma seminal isolado (Matthijs, Engel & Woelders, 2003; Troedsson et al., 2001).

Em relação ao volume do ejaculado, vários autores concluíram que a resposta inflamatória uterina após cobertura natural não difere da obtida numa IA com sémen refrigerado, apesar do volume do ejaculado ser superior na cobertura natural, variando normalmente entre 30mL a 70mL (Kotilainen et al., 1994; Nikolakopoulos & Watson, 2000; Sieme, Katila & Klug, 2004).

4.1.3. Tipo de sémen

Esta variável apresentou uma tendência para a significância, sendo observável que a presença de fluido uterino foi superior nas éguas inseminadas com sémen congelado. Estes

resultados estão de acordo com o esperado, sendo consensual na bibliografia consultada que o sémen congelado causa uma maior reação inflamatória do que o sémen refrigerado, por diversas razões. Antes de mais, nas doses inseminantes com sémen congelado são utilizadas maiores concentrações espermáticas, em baixos volumes finais (Samper, Estrada & Mckinnon, 2007). Vários autores concluíram que uma concentração espermática elevada conduz a uma reação inflamatória mais exuberante pois constitui um estímulo quimiotático maior e está associada a uma alteração do transporte dos espermatozoides, uma vez que os PMN suprimem a motilidade espermática (Alghamdi, Troedsson, Laschkewitsch & Xue, 2001; Fiala et al., 2007). Num estudo realizado por Campbell e England (2006), foi concluído que IA com baixos volumes inseminantes, como é o caso do sémen congelado, está associada a uma diminuição das contrações do miométrio e consequente diminuição da depuração uterina, provavelmente devido a uma falta de estimulação dos recetores de tensão uterinos. Adicionalmente, existem diferenças entre a IA com sémen refrigerado e congelado em relação ao local de deposição do sémen (corpo do útero e corno uterino, respetivamente) e ao momento da IA, que podem influenciar a resposta inflamatória uterina. Cazales et al. (2016) concluíram que o local de inseminação pode afetar a reação inflamatória uterina, mas que não é ainda evidente qual destas duas técnicas de IA causa maior reação inflamatória por parte do endométrio. Relativamente ao momento de deposição do sémen, pré-ovulatória no caso do sémen refrigerado e pós-ovulatória no caso do sémen congelado, aparentemente não existe influência deste parâmetro na incidência de fluido intrauterino 12 horas depois. A progesterona está associada à diminuição das defesas e depuração uterinas e aumenta poucas horas após a ovulação e, por isso, seria de esperar que uma IA pós-ovulatória pudesse predispor à acumulação de fluido intrauterino. No entanto, não há evidência de que isso aconteça (Watson et al., 2001).

Por último, os diluidores utilizados diferem na sua composição, sendo que no caso do sémen refrigerado são à base de leite e no caso do sémen congelado possuem gema de ovo na sua constituição básica. Os diluidores constituem um estímulo quimiotático maior ou menor, dependendo da sua composição. Palm, Walter, Budik e Aurich (2006), verificaram que a infusão intrauterina de diluidor de gema de ovo provocou um menor influxo de PMN para as camadas superficiais do endométrio do que o diluidor à base de leite, o qual constituiu um estímulo mais agressivo para o endométrio. Adicionalmente, a gema de ovo contém corticosteroides, androgénios e progesterona, que podem possuir efeito anti-inflamatório. Alguns autores observaram uma reação mais exuberante aos diluidores à base de leite e sugeriram que esta pode ser provocada por uma reação de hipersensibilidade às caseínas e lactoglobulinas do mesmo (Fiala et al., 2002; Palm et al., 2008). Apesar dos diluidores à base de leite estarem associados a uma maior reação inflamatória, o glicerol e a gema de ovo presentes nos diluidores de congelação podem provocar reações de hipersensibilidade e

atraso na depuração uterina nas éguas susceptíveis à endometrite (Card, 2005; Palm et al., 2006), o que é consistente com o resultado deste trabalho.

4.1.4. Repetição da IA ou salto

A repetição da IA ou do salto influenciou muito significativamente e positivamente a presença de fluido uterino à ecografia. Foi observado que 84.6% das éguas submetidas a mais do que uma IA ou cobertura apresentaram fluido uterino. Após a IA ou cobertura, ocorre uma resposta inflamatória fisiológica, com um pico máximo de inflamação entre as 6 e as 12 horas após a IA a cobertura. Se as éguas forem cobertas duas vezes em 24 horas, o sêmen da segunda IA vai ser introduzido num ambiente inflamatório, ocorrendo uma maior reação inflamatória (Alghamdi, Foster & Troedsson, 2004; Alghamdi, Troedsson, Laschkewitsch & Xue, 2001). O resultados deste estudo estão assim de acordo com o postulado, uma vez que quantas mais IA ou cobrições se realizarem no mesmo ciclo, maior grau de inflamação uterina e, consequentemente, maior acumulação de fluido no útero (Pycock, 2007b).

4.1.5. Presença de fluido uterino

Como esperado, a presença de fluido uterino à ecografia influenciou significativamente e negativamente o resultado do diagnóstico de gestação, tendo sido observado que o diagnóstico de gestação negativo está mais relacionado com a presença de fluido no útero. A observação de fluido uterino à avaliação ecográfica é considerado o principal sinal de endometrite (Troedsson & Woodward, 2016). A presença deste sinal clínico às 48 horas após cobertura é preocupante, pois é necessário um ambiente não-inflamatório para a sobrevivência do embrião (Card, 2005). O fluido uterino está, assim, relacionado com uma diminuição da fertilidade e baixas taxas de gestação, revelando-se fundamental uma monitorização ecográfica regular, de modo a detetar a presença e quantificar o volume do fluido presente (Leblanc & Causey, 2009; LeBlanc, 2010; Liu, 2011).

4.2. Grupo 2 (Pós-IA ou cobertura)

4.2.1. Presença e quantidade de fluido uterino

Apesar das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas, foi possível verificar uma discrepância nas medições de fluido uterino em relação à presença de endometrite, sendo que a média das medições de fluido uterino à ecografia das éguas que apresentaram inflamação é superior às restantes.

A visualização de fluido uterino à ecografia, pós-IA ou cobertura, é considerado o principal sinal de endometrite, estando muito associado com a inflamação repetida e com a presença de PMN, que migram através dos vasos sanguíneos para o lúmen uterino durante a inflamação (Pycock, 2007; Troedsson, 2006). Após a IA ou cobertura, há uma resposta inflamatória uterina que é fisiológica e necessária para a remoção dos espermatozoides e eventuais

contaminantes introduzidos no útero, sendo normal a detecção de fluido uterino à ecografia. As éguas suscetíveis não conseguem resolver a inflamação fisiológica associada à cobrição e mantêm uma inflamação persistente, verificando-se a acumulação de fluido intrauterino por mais de 12 horas após a cobrição e edema endometrial durante mais de 3 a 5 dias pós-IA (Pycock & Newcombe, 1996; Troedsson, 1997). Assim sendo, seria de esperar um resultado citológico positivo nas 32 éguas que apresentaram fluido uterino à ecografia. Todavia, isto não se verificou, uma vez que 7 éguas apresentaram medições de fluido uterino muito discrepantes e não exibiram inflamação uterina. Este facto está de acordo com a bibliografia consultada, uma vez que pode haver acumulação de fluido uterino por outras razões que não a presença de inflamação, como por exemplo a redução das contrações do miométrio, a degenerescência vascular, a diminuição da drenagem linfática, um útero pendular e a incompetência cervical. No entanto, estes fatores resultam numa dificuldade na depuração uterina que pode predispor ao aparecimento de endometrite (Pycock, 2007b).

Alguns autores referem que a presença de mais do que 2 cm da medida máxima de fluido intrauterino observada entre as 6 e as 36 horas pós-IA é considerado um bom indicador da suscetibilidade à endometrite persistente associada à cobrição (Barbacini, Necchi, Zavaglia & Squires, 2003; LeBlanc, 2010; Pycock, 2007). Neste trabalho, todavia, a medida limiar de 2 cm de fluido uterino quando usada isoladamente poderá não ser um bom indicador da inflamação, uma vez que foram observados valores de fluido uterino muito díspares nas éguas que apresentaram inflamação uterina, verificando-se ainda a presença de endometrite em éguas com medidas de fluido uterino inferiores a 2 cm. Adicionalmente, foi observada uma quantidade superior a 2 cm de fluido em 2 éguas que não apresentaram inflamação uterina na citologia. Contudo, nas éguas com endometrite, esta medida mostrou ser um bom parâmetro indicador do grau de inflamação, visto que todas as éguas que apresentaram mais do que 2 cm de fluido no útero tinham endometrite grave.

Adicionalmente, pode ocorrer endometrite subclínica, caracterizada pela presença de inflamação não acompanhada de fluido uterino (Buczkowska et al., 2014; Leblanc & Causey, 2009), como verificado num estudo realizado por Woodward et al. (2012), em que foi observado que algumas éguas não continham fluido no útero às 48 horas pós-IA mas apresentaram uma citologia positiva, indicando a presença de inflamação. Neste trabalho isso não se verificou, provavelmente devido ao número reduzido da amostra, sendo que foram apenas avaliadas duas éguas que não continham fluido no útero e não foi observada inflamação uterina em nenhuma delas.

Pode-se concluir que, apesar de ser um indicador da endometrite, apenas a avaliação ecográfica da presença e quantidade de fluido uterino às 24 horas pós-IA ou cobrição não é um bom parâmetro para o diagnóstico definitivo de endometrite, devendo ser associado a outras técnicas de diagnóstico, como a avaliação citológica de amostras endometriais (Card, 2005; Fioratti et al., 2009).

4.2.2. Presença de bactérias

De acordo com os resultados obtidos, é possível verificar que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de fluido uterino avaliado ecograficamente em relação à presença de bactérias. Contudo, notou-se um aumento do grau de inflamação uterina nas éguas infetadas, apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas.

Durante a IA ou cobertura natural, podem ser introduzidas bactérias no útero, sendo eliminadas até 12 horas após inoculação nas éguas resistentes. No entanto, nesta fase do ciclo éstrico, a concentração de progesterona vai aumentando, havendo uma menor capacidade de resolução da infeção devido ao seu efeito imunossupressor (Brito & Barth, 2003; Causey, 2007). Assim, nas éguas suscetíveis, que não conseguem remover as bactérias nesse período de tempo, pode desenvolver-se uma infeção bacteriana e uma inflamação persistente, caracterizada normalmente pela presença de fluido uterino (Madsen & Christensen, 1995; Ricketts & Mackintosh, 1987; Troedsson, 1997). Contudo, embora normalmente associado à presença de uma inflamação aguda, o fluido uterino nem sempre está presente e não indica necessariamente uma infeção bacteriana, pois existem várias causas anteriormente mencionadas que podem levar à acumulação de fluido no útero (LeBlanc, 2010). De facto, das 32 éguas que apresentaram fluido uterino à ecografia, apenas 13 tinham bactérias.

Os resultados deste trabalho estão de acordo com a bibliografia, dado que a presença de fluido e o grau de resposta inflamatória por parte do útero são influenciados por vários fatores, incluindo o tipo de bactéria presente. Em estudos anteriores foram encontradas várias correlações entre a ecografia, a cultura e a citologia do endométrio. Foi observado que nem sempre a presença de microrganismos está associada a uma resposta inflamatória e que o grau de inflamação observado na citologia endometrial varia consoante a bactéria presente (Riddle et al., 2007). Os *Streptococcus β -hemolyticus* e a *Klebsiella* spp. estão relacionados com uma maior frequência de citologias uterinas positivas, ao contrário da *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas* spp. (Burlison et al., 2010; Riddle et al., 2007). Neste trabalho foi observado que 8 éguas apresentaram cocos Gram-positivos, 3 apresentaram bacilos Gram-positivos, 1 égua apresentou bacilos Gram-negativos e ocorreu uma infeção mista (com bacilos gram-negativos e cocos Gram-positivos) em apenas 1 égua. A presença de bacilos Gram-positivos é consistente com uma infeção por *Actinobacillus* spp. ou *Corynebacterium* spp. (Albihn, Baverud & Magnusson, 2003; Benko et al., 2015). A presença de cocos Gram-positivos é consistente com uma infeção por *Streptococcus β -hemolyticus*. Os bacilos Gram-negativos tipicamente isolados de éguas com endometrite incluem a *E. coli*, *P. aeruginosa* e a *K. pneumoniae* (Sertich, 2007).

De facto, neste trabalho, todas as éguas infetadas apresentaram fluido uterino e observou-se que, apesar da maioria apresentar uma inflamação uterina grave, 3 éguas apresentaram outros graus de inflamação e inclusivamente uma égua estava infetada e não apresentou

inflamação do útero à citologia. No entanto, este resultado pode ser um falso positivo, se tiver ocorrido contaminação da amostra com microrganismos provenientes do trato genital caudal ou do meio ambiente (Buczowska et al., 2014; Cadario, 2014; LeBlanc et al., 2007). O isolamento bacteriano não comprova necessariamente a presença de uma endometrite, assim como o não isolamento bacteriano não descarta a sua presença (Riddle et al., 2007). Para minimizar qualquer má interpretação dos resultados, estes devem ser sempre interpretados em conjunto com o resultado da citologia (Sertich, 2007; Troedsson, 2011).

4.2.3. Presença de linfócitos

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas relativamente à associação entre a presença de linfócitos e de bactérias, sendo que apenas 5 éguas apresentaram estes dois tipos de células concomitantemente. Pelo contrário, foi possível verificar que o grau da inflamação uterina influenciou muito significativamente a presença de linfócitos, sendo notório que apenas as éguas com inflamação uterina grave apresentaram este tipo de célula.

Seria de esperar uma percentagem superior de éguas com bactérias e linfócitos na citologia. No entanto, das éguas infetadas e com inflamação uterina grave, apenas 4 éguas não apresentaram linfócitos na citologia, o que poderá ser provavelmente devido à infeção ter ocorrido mais recentemente, não estando ainda desenvolvido um quadro de endometrite crónica. Esta observação é concordante com a bibliografia, uma vez que uma infeção crónica e a presença de uma população mista de microrganismos causam uma condição fibrótica grave do endométrio, ocorrendo um influxo contínuo de linfócitos para o útero (Aresu et al., 2012; Hoffmann et al., 2009a; Hoffmann et al., 2009b).

Apesar de poder ser observado um pequeno número de linfócitos dispersos no endométrio normal, o seu aumento está relacionado com a ocorrência de um processo inflamatório crónico e o seu influxo contínuo para o útero contribui para a endometrose. Assim, as éguas que apresentaram este tipo de célula na citologia possuem provavelmente modificações do endométrio, como o desenvolvimento de fibrose e alterações glandulares, o que contribui para a suscetibilidade à endometrite e aparecimento de mais células inflamatórias (Carnevale & Ginther, 1992; Pycock, 2007b). Este facto justifica a forte associação entre a presença de linfócitos e a inflamação uterina grave, verificada neste trabalho.

4.2.4. Grau de inflamação

Apesar das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas, foi possível verificar uma discrepância entre o grau de inflamação e o resultado do diagnóstico de gestação, sendo que a média da percentagem de PMN das lavagens uterinas em que se verificou um diagnóstico de gestação negativo é superior à média das éguas que ficaram gestantes.

Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois o endométrio é responsável por assegurar o desenvolvimento do embrião, estando provado que o ambiente uterino alterado associado à presença de inflamação compromete a sobrevivência do mesmo, resultando em baixas taxas de gestação. De facto, um aumento do número de PMN está relacionado com uma menor taxa de gestação (Riddle et al., 2007; Sertich, 2007). Adicionalmente, a inflamação uterina persistente é acompanhada pela produção de substâncias luteolíticas, como prostaglandinas, o que resulta numa luteólise precoce, com rápido declínio da concentração de progesterona e um retorno precoce ao estro, resultando em morte embrionária (Pycock, 2007b; Vanroose, Kruif & Soom, 2000).

Neste trabalho, as diferenças no resultado do diagnóstico de gestação em relação ao grau de inflamação não foram estatisticamente significativas possivelmente devido ao efeito benéfico do protocolo terapêutico instituído. De facto, das 25 éguas que apresentaram endometrite, 10 ficaram gestantes, uma vez que foram provavelmente capazes de eliminar os contaminantes e produtos inflamatórios do lúmen uterino, permitindo assim o restabelecimento de um ambiente uterino adequado para receber o embrião.

4.2.5. Repetição das lavagens uterinas

A repetição das lavagens uterinas influenciou significativamente e negativamente o resultado do diagnóstico de gestação, tendo sido observado que o diagnóstico de gestação positivo está mais relacionado com uma única lavagem uterina. Foi observado que das 10 éguas submetidas a mais do que uma lavagem uterina por ciclo, apenas 1 ficou gestante.

Estes resultados estão de acordo com o esperado, por variadas razões. Antes de mais, o protocolo terapêutico baseado nas lavagens uterinas foi efetuado sempre que se verificou fluido uterino à ecografia e, por isso, todas as éguas que não conseguiram eliminar o fluido após a primeira lavagem foram submetidas a nova lavagem uterina. Assim sendo, as repetições deste tratamento englobam as éguas que apresentaram mais dificuldade na resolução da endometrite. Adicionalmente, 9 destas éguas tinham endometrite grave e 1 égua apresentou endometrite moderada. Deste modo, é natural que o global dos resultados de diagnóstico de gestação seja pior nestas éguas, pois a inflamação uterina está mais associada a diagnósticos de gestação negativos, como explicado no ponto anterior.

Através de uma análise descritiva dos dados relativos às citologias das lavagens uterinas repetidas do mesmo ciclo deste grupo de éguas, foi possível verificar a ocorrência de uma melhoria do grau da inflamação em 6 éguas após a repetição da lavagem uterina e um desaparecimento da presença de bactérias em 3 éguas. Estes resultados podem ser explicados pela realização de tratamento adicional em 3 destas éguas e pela ação benéfica da lavagem uterina, que se traduz no auxílio da remoção de detritos, microrganismos, PMN e outras substâncias que podem interferir com a absorção de antibióticos pela mucosa uterina e com a ação dos PMN e contribui para a depuração uterina através da estimulação das

contrações do miométrio (Leblanc & Causey, 2009). No entanto, verificou-se um aumento do grau de inflamação em 2 éguas e foi possível observar um aparecimento de bactérias após lavagens uterinas repetidas em 3 éguas. Este aumento da endometrite pode ser justificado pela irritação mecânica do endométrio que este tratamento provoca, o que o que contribui para o recrutamento de novos PMN (Leblanc & Causey, 2009). Adicionalmente, foi observado que, aparentemente, a manipulação transretal do útero e do cérvix pode ser suficiente para induzir um aumento transitório dos PMN no útero (Williamson et al., 1987). O aparecimento das bactérias pode ser explicado por contaminação do útero ou do fluido de lavagem. As medidas de higiene tornam-se assim muito importantes para minimizar o risco de contaminação pelo trato reprodutivo inferior ou contaminação iatrogénica (Buczkowska et al., 2014; Ferris, Bohn & Mccue, 2015). Isto revela-se especialmente importante durante o diestro, à medida que os níveis de progesterona continuam a subir. Consequentemente, um tratamento pós-ovulatório aumenta o risco de infeção uterina, devido ao efeito imunossupressor desta hormona. Adicionalmente, o fluido uterino tem menor probabilidade de ser drenado à medida que o cérvix vai contraindo (Pycock, 2007b).

4.2.6. Tratamento adicional

Apesar das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas, foi possível verificar que todas as éguas submetidas a um protocolo terapêutico adicional obtiveram um resultado de diagnóstico de gestação negativo. Todas as éguas avaliadas neste grupo foram submetidas a lavagem uterina e a administração única ou repetida de 25 UI de ocitocina IM. O tratamento adicional foi específico e adequado a cada égua, tendo em consideração a sua história reprodutiva e o sucesso de tratamentos previamente aplicados. Este, dependendo dos casos, consistiu na administração intrauterina e sistémica de antibióticos, na administração de fármacos corticosteroides e na aplicação tópica de misoprostol ao nível do cérvix. O protocolo terapêutico adicional foi aplicado somente em 4 éguas, tendo sido posteriormente verificado que estas possuíam inflamação uterina grave e não ficaram gestantes. Foi ainda observado que apenas uma destas éguas não estava infetada. Deste modo, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, pois o tratamento adicional foi aplicado a éguas que à partida teriam mais dificuldade em ficar gestantes, uma vez que apresentaram inflamação e infeção uterina. No entanto, não é possível retirar conclusões definitivas dada a quantidade reduzida de éguas tratadas. Adicionalmente, tendo em conta que não foi realizada microbiologia endometrial, bem como um TSA, não é possível confirmar se o tratamento adicional realizado foi o mais adequado. De acordo com a bibliografia, idealmente deve ser confirmada previamente a presença de bactérias, efetuado o seu isolamento e um TSA, de modo a ser administrado o antibiótico adequado a cada caso. Quando isto não é possível, devem ser utilizados antibióticos de largo espectro (LeBlanc, 2010).

Num estudo anterior, foi observada uma taxa de gestação considerada aceitável em éguas que tinham inflamação moderada na avaliação citológica (46,5%), mas que diminuiu nas éguas com inflamação grave (21%), indicando assim que a realização de tratamento é especialmente importante nestas éguas (Riddle et al., 2007). Apesar de estar demonstrado um efeito benéfico da utilização de tratamento pós-IA ou cobrição, evidenciado pela melhoria do ambiente uterino, continua a existir uma maior dificuldade em obter um diagnóstico de gestação positivo nas éguas suscetíveis, o que é concordante com os resultados deste trabalho (Causey, 2007; Riddle et al., 2007).

4.3. Grupo 3 (Pré-IA ou cobrição)

4.3.1. Presença e quantidade de fluido uterino

Apesar das diferenças observadas não serem estatisticamente significativas, foi possível verificar que a média das medições de fluido uterino à ecografia das éguas que apresentaram inflamação foi ligeiramente superior às restantes.

Antes da IA ou cobrição é essencial a realização de uma avaliação ecográfica das características do útero, de modo a ser detetada a presença de fluido uterino, identificando assim as éguas que possuem problemas de depuração uterina, o que sugere suscetibilidade à endometrite persistente. Como referido anteriormente, a acumulação de fluido uterino é um dos sinais mais característicos da endometrite. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a presença de fluido intrauterino durante o estro foi associado a um aumento do número de PMN (Burleson et al., 2010; LeBlanc, 2010). Contudo, isto não se verificou em todas as éguas, uma vez que das 10 éguas avaliadas antes da IA ou cobrição, apenas 4 apresentaram inflamação uterina. Este facto está de acordo com a bibliografia consultada, uma vez que pode haver acumulação de fluido uterino durante o estro por outras razões, como um excesso de produção de fluido por alterações glandulares, uma falha da drenagem linfática, dificuldade na depuração uterina via cérvix ou degenerescência vascular (Pycock, 2007b). As éguas deste grupo apresentaram idade média de 15 anos, o que pode ter contribuído para o aparecimento destas alterações.

Ao contrário do que ocorre no diestro, no estro, especialmente no início desta fase, é normal a observação ecográfica de pequenas acumulações de fluido no útero. Este fluido vai sendo drenado à medida que o cérvix vai relaxando por influência dos estrogénios (Pycock, 2007b). O aparecimento de mais de 2 cm de fluido à ecografia durante o estro é um indicador de suscetibilidade à endometrite e afeta a taxa de concepção (Barbacini, Necchi, Zavaglia & Squires, 2003; LeBlanc, 2010). No entanto, neste estudo foi verificada a presença de inflamação grave em éguas com medidas de fluido uterino inferiores a 2 cm. Assim, foi demonstrado, uma vez mais, que a medição de fluido uterino à ecografia isoladamente poderá não ser um bom indicador da endometrite, verificando-se valores de fluido uterino muito díspares nas éguas que apresentaram inflamação. Todavia a medida de 2 cm mostrou ser um

bom parâmetro indicador do grau de inflamação, pois todas as éguas que apresentaram mais de 2 cm de fluido uterino tinham endometrite grave.

4.3.2. Presença de bactérias

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas diferenças revelantes e estatisticamente significativas na quantidade de fluido uterino avaliado ecograficamente em relação à presença de bactérias. Pelo contrário, foi possível verificar que a presença de bactérias influenciou significativamente o grau de inflamação uterina, sendo que todas as éguas que apresentaram bactérias tinham inflamação grave e somente uma égua apresentou inflamação grave não acompanhada da presença de bactérias.

Estudos anteriores demonstraram que o fluido uterino que se acumula antes da IA ou cobrição é normalmente estéril. Adicionalmente, as defesas uterinas estão aumentadas durante o estro, o cérvix encontra-se aberto e existem contrações expulsivas do miométrio e maior atividade fagocitária (Brito & Barth, 2003; Causey, 2007). Contudo, das 10 éguas avaliadas, 3 apresentaram bactérias, o que pode estar relacionado com uma infecção uterina previamente adquirida. Foi observado que 1 égua apresentou cocos Gram-positivos, 1 apresentou bacilos Gram-positivos e ocorreu uma infecção mista (com bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos) em apenas 1 égua. A presença de bacilos Gram-positivos é consistente com uma infecção por *Actinobacillus* spp. ou *Corynebacterium* spp. (Albihn et al., 2003; Benko et al., 2015). Como mencionado anteriormente, a presença de cocos Gram-positivos é consistente com uma infecção por *Streptococcus* β -*hemolyticus*. Os bacilos Gram-negativos tipicamente isolados de éguas com endometrite incluem a *E. coli*, *P. aeruginosa* e a *K. pneumoniae* (Sertich, 2007). Não pode, no entanto, ser excluída a possibilidade de contaminação do fluido recolhido. É possível concluir que, neste trabalho, a presença de inflamação pré-IA parece ser causada por uma infecção, sendo que apenas uma égua apresentou inflamação uterina não associada à presença de bactérias.

Apesar da sua natureza não inflamatória, o fluido pode atuar como meio de cultura para as bactérias que eventualmente entram no útero durante a IA ou cobrição (Pycock, 2007b). Adicionalmente, o fluido livre inativa as proteínas do complemento necessárias à fagocitose dos PMN e separa as pregas endometriais, o que dificulta a depuração mucociliar e retira uma superfície na qual os PMN podem fagocitar as bactérias (Troedsson, 1999). Este trabalho está de acordo com o indicado, uma vez que através de uma análise descritiva dos dados relativos às citologias das lavagens uterinas pós-IA ou cobrição das 7 éguas deste grupo que apresentaram fluido após a IA, foi possível verificar a ocorrência de um aparecimento de bactérias e aumento do grau de inflamação uterina em 3 éguas. Foi verificada uma melhoria do grau da inflamação e desaparecimento das bactérias em apenas 1 égua, sem a realização de tratamento antibiótico, o que pode ser explicado pelo efeito benéfico da lavagem uterina e pelo estudo realizado por Rasmussen et al. (2015), em que se verificou que metade das éguas

que apresentaram crescimento bacteriano nas amostras pré-IA, não apresentaram nas amostras pós-IA, possivelmente devido a uma estimulação da depuração uterina pela IA.

4.3.3. Presença de linfócitos

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas relativamente à associação entre a presença de linfócitos e de bactérias, sendo que somente 1 égua apresentou os dois tipos de células concomitantemente. Apesar de não ser estatisticamente significativa, observou-se uma associação entre o grau da inflamação uterina e a presença de linfócitos, sendo que a média da percentagem de PMN das lavagens uterinas em que se verificou a presença de linfócitos foi superior às restantes.

Foi notória uma menor correlação entre estas variáveis antes da IA ou cobrição em relação ao observado no grupo 2. Pelas razões anteriormente mencionadas, seria de esperar uma percentagem superior de éguas com bactérias e linfócitos na citologia e uma maior associação entre a presença de linfócitos e a inflamação uterina grave, o que não se verificou, uma vez que apenas metade das éguas com endometrite grave apresentaram linfócitos.

Tendo em consideração que as éguas que apresentam fluido uterino pré-IA ou cobrição são normalmente éguas com predisposição à endometrite persistente, é normal o aparecimento de linfócitos em 4 éguas pois, como referido anteriormente, este tipo de célula está associado a alterações crónicas do endométrio e consequente aumento da suscetibilidade à endometrite (Carnevale & Ginther, 1992; Pycock, 2007b).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos, após a realização deste trabalho foi concluído que:

- Existem muitas variáveis que influenciaram significativamente o aparecimento de fluido no útero, nomeadamente a idade da égua, o tipo de reprodução e a repetição da IA ou salto;
- A presença de fluido uterino e as éguas que necessitaram de mais do que uma lavagem uterina por ciclo influenciaram significativamente o diagnóstico de gestação negativo;
- Existe uma correlação significativa entre a inflamação uterina e a presença de linfócitos pós-IA ou cobrição e entre a presença de bactérias e a inflamação uterina pré-IA ou cobrição;
- A percentagem de éguas com inflamação uterina foi superior no grupo 2, confirmando a importância do estímulo inflamatório associado à IA ou cobrição. Contudo, a média do fluido uterino medido à ecografia das éguas com endometrite foi semelhante nos dois grupos;
- A avaliação ecográfica da presença e quantidade de fluido uterino, apesar de ser um indicador da endometrite, não constituiu um método infalível de diagnóstico definitivo da mesma.

Após a conclusão final, revela-se importante o recurso a outros meios complementares de diagnóstico, como a avaliação citológica de amostras endometriais das éguas que revelem fluido uterino à ecografia e como procedimento de rotina antes da IA nas éguas suscetíveis. Sugere-se o uso da zaragatoa uterina ou escova citológica como técnicas de recolha de amostras, devido à sua fácil realização, menor custo, maior segurança e uma vez que a lavagem uterina por si só constitui um estímulo irritante para o endométrio.

Contudo, dada a elevada casuística observada neste centro de reprodução, com uma elevada carga de trabalho num período de tempo concentrado, nem sempre é possível a utilização de outros métodos de diagnóstico. Para além da componente financeira, o tempo despendido no processamento das amostras e na transmissão dos resultados não é conciliável com uma tomada de decisão que tem de ser rápida, dado o curto período de tempo disponível para melhorar o ambiente uterino antes da chegada do embrião. Adicionalmente, este centro tem como prioridade maximizar a saúde e eficiência reprodutiva das éguas, reduzindo as falhas da concepção. Para tal, a opção de tratamento foi específica para cada égua, tendo em consideração a história reprodutiva da mesma e o sucesso de tratamentos previamente aplicados. No final deste estudo, confirmou-se a importância que a atuação precoce no diagnóstico e tratamento das endometrites revela na redução do impacto económico das mesmas.

PARTE IV: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, A. A., Breathnach, C. C., Katepalli, M. P., Kohler, K. & Horohov, D. W. (2008). Advanced age in horses affects divisional history of T cells and inflammatory cytokine production. *Mechanisms of Ageing and Development*, vol.129,pp. 656–664.
- Adams, G., Kastelic, J., Bergfelt, D. & Ginther, O. (1987). Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol.35,pp. 445–454.
- Albihn, A., Baverud, V. & Magnusson, U. (2003). Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol.44,pp. 121–129.
- Alghamdi, A. S. & Foster, D. N. (2005). Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biology of Reproduction*, vol.73,pp. 1174–81.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Carlson, C. S. & Troedsson, M. H. T. (2005). Nitric Oxide Levels and Nitric Oxide Synthase Expression in Uterine Samples from Mares Susceptible and Resistant to Persistent Breeding-induced Endometritis. *American Journal of Reproductive Immunology*, vol.53,pp. 230–237.
- Alghamdi, A. S., Foster, D. N. & Troedsson M. H. T. (2004). Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMN's) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*, vol.127,pp. 593–600.
- Alghamdi, A., Troedsson, M. H. T., Laschkewitsch, T. & Xue, J. L. (2001). Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology*, vol.55,pp. 1019–1028.
- Allen, W. R., Brown, L., Wright, M. & Wilsher, S. (2007). Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Veterinary Journal*, vol.39,pp. 438–45.
- Amulic, B. & Hayes, G. (2011). Neutrophil extracellular traps. *Current Biology*, vol.21,pp. 297–298.
- Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M. & Falomo, M. E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *Journal of Veterinary Science*, vol.13,pp. 171–177.
- Asbury, A. C., Halliwell, R. E. W., Foster, G. W. & Longino, S. J. (1980). Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology*, vol.14,pp. 299–308.
- Aurich, C. & Spergser, J. (2007). Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, vol.67,pp. 912–918.
- Barbacini, S., Necchi, D., Zavaglia, G. & Squires, E. L. (2003). Retrospective Study on the Incidence of Postinsemination Uterine Fluid in Mares Inseminated with Frozen/Thawed Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 23 (11), pp. 493-496
- Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J. & Palmer, E. (1997). Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology*, vol.48,pp. 391–410.
- Beltaire, K. A., Cheong, S. H. & Silva, M. A. C. (2012). Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999 – 2011), vol.43,pp. 84–87.

- Benko, T., Boldizar, M., Novotny, F., Hura, V., Valocky, I., Dudrikova, K., Karamanova, M. & Petrovic, V. (2015). Incidence of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares during the foal heat cycle. *Veterinarni Medicina*, vol.60, pp. 613–620.
- Bergfelt, D. (2009). Anatomy and physiology of the mare. In J. Samper (Ed.), *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (2nd ed., pp. 113–131). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Bradecamp, E. A., Ahlschwede, S. A. & Cook, J. L. (2014). The effects of intra-uterine kerosene infusion on endometrial epithelial cilia concentration. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.34, pp. 134.
- Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, vol.303, pp. 1532–1535.
- Brinsko, S., Blanchard, T., Schumacher, J., Varner, D. & Love, C. (2011). *Manual of equine reproduction* (3rd ed.). Philadelphia, PA, USA: Mosby/Elsevier.
- Brito, L. & Barth, A. (2003). Endometritis in mares. *Large Animal Veterinary Rounds*, vol.3, pp. https://www.researchgate.net/publication/213858523_Endometritis_in_mares
- Buczowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Staroniewicz, Z. & Siemieniuch, M. J. (2014). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol.12, pp. 27.
- Burleson, M. D., LeBlanc, M. M., Riddle, W. T. & Hendricks, E. M. (2010). Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. *AAEP Proceedings*, vol.56, pp. 317.
- Cadario, M. (2014). revisiting the diagnosis and the treatment options for an old problem: chronic and post-breeding endometritis in the mare. *The Practitioner*, vol.1, pp. 21–25.
- Campbell, M. L. H. & England, G. C. W. (2006). Effects of coitus and the artificial insemination of different volumes of fresh semen on uterine contractions in mares. *The Veterinary Record*, vol.159, pp. 843–849.
- Canisso, I. F., Stewart, J. & Coutinho da Silva, M. A. (2016). Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, vol.32, pp. 465–480.
- Card, C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, vol.64, pp. 580–588.
- Card, C., Carley, S., Green, J. & Chirino-Trejo, M. (2004). Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. *AAEP Proceedings*, vol.50, pp. 505–9.
- Carnevale, E. M. & Ginther, O. J. (1992). Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, vol.37, pp. 1101–1115.
- Caslick, E. (1937). The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. *Cornell Vet*, vol.27, pp. 178.
- Causey, R. (2007). Uterine Therapy for Mares with Bacterial Infections. In *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 105–115).
- Causey, R. C. (2006). Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. *The Veterinary Journal*, vol.172, pp. 405–421.

- Causey, R. C. (2007). Mucus and the mare: How little we know. *Theriogenology*, vol.68,pp. 386–394.
- Causey, R. C., Miletello, T., O'Donnell, L., Lyle, S. K., Paccamonti, D. L., Anderson, K. J., Eilts, B. E., Morse, S & LeBlanc, M. M. (2008). Pathologic effects of clinical uterine inflammation on the equine endometrial mucosa. *AAEP Proceedings*, vol.54,pp. 276–277.
- Causey, R., Ginn, P., Katz, B., Hall, B., Anderson, K. & LeBlanc, M. (2000). Mucus production by endometrium of reproductively healthy mares and mares with delayed uterine clearance. *Journal of Reproduction and Fertility*, ,pp. 333–9.
- Cazales, N., Hauret, P., Cavestany, D. & Mattos, R. C. (2016). Effect of insemination site on uterine inflammatory response of mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.43,pp. 70–71.
- Cheung, A., Liu, I., Walsh, E. & Mille, M. (1985). Phagocytic and killing capacities of uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis. *American Journal of Veterinary Research*, vol.46,pp. 1938–40.
- Christoffersen, M., Söderlind, M., Rudefalk, S. R., Pedersen, H. G., Allen, J. & Krekeler, N. (2015). Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. *Theriogenology*, vol.84,pp. 1283–1290.
- Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A. M., Jacobsen, S., Petersen, M. R., Troedsson, M. H. & Lehn-Jensen, H. (2012). Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Veterinary Research*, vol.8,pp. 41.
- Christoffersen, M., Woodward, E. M., Bojesen, A. M., Petersen, M. R., Squires, E. L., Lehn-Jensen, H. & Troedsson, M. H. T. (2012). Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. *Theriogenology*, vol.78,pp. 991–1004.
- Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., Paraggio, G. & Pasolini, M. P. (2012). Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, vol.77,pp. 89–98.
- Coutinho da Silva, M. A., Darr, C. R., Moraes, L. E. & Forshey, B. S. (2017). Lactoferrin Modulates Uterine Inflammation Postbreeding in the Mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.56,pp. 63–67.
- Cuervo-Arango, J. & Newcombe, J. R. (2008). Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology*, vol.69,pp. 681–687.
- Dascanio, J. (2007). Treatment of Fungal Endometritis. In *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 116–120).
- Dascanio, J. (2011). How and When to Treat Endometritis With Systemic or Local Antibiotics. *AAEP Proceedings*, vol.57,pp. 24–31.
- Dascanio, J., Schweizer, C., & Ley, W. (2001). Equine fungal endometritis. *Equine Veterinary Education*, vol.13,pp. 324–329.
- Defontis, M., Vaillancourt, D., & Grand, F. X. (2011). Comparison of three methods of sampling for endometrial cytology in the mare: Preliminary study. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*, vol.39,pp. 171–175.

- Doty, a, Buhi, W. C., Benson, S., Scoggin, K. E., Pozor, M., Macpherson, M., Mutz, M & Troedsson, M. H. T. (2011). Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. *Biology of Reproduction*, vol.85,pp. 157–64.
- Duru, M., Nacar, A., Yönden, Z., Kuvandık, G., Helvacı, M. R., Koç, A., Akaydin, Y., Öksüz, H & Söğüt, S. (2008). Protective Effects of N-Acetylcysteine on Cyclosporine-A-Induced Nephrotoxicity. *Renal Failure*, vol.30,pp. 453–459.
- England, G. (2005). *Fertility & obstetrics in the horse*. (B. Science, Ed.) (3rd ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Estany, S., Palacio, J. R., Barnadas, R., Sabes, M., Iborra, A. & Martínez, P. (2007). Antioxidant activity of N-acetylcysteine, flavonoids and α -tocopherol on endometrial cells in culture. *Journal of Reproductive Immunology*, vol.75,pp. 1–10.
- Esteller-Vico, A., Liu, I. K. M., Steffey, E. P., Vaughan, M. E. & Brosnan, R. J. (2007). Effect of vascular degeneration on utero-ovarian blood flow and perfusion in the cyclic mare. *Theriogenology*, vol.68,pp. 506.
- Farca, a M., Nebbia, P. & Re, G. (1993). Potentiation of the in vitro activity of some antimicrobial agents against selected gram-negative bacteria by EDTA-tromethamine. *Veterinary Research Communications*, vol.17,pp. 77–84.
- Ferreira-Dias, G., Nequin, L. & King, S. (1994). Morphologic characteristics of equine endometrium classified as Kenney categories I, II, and III, using light and scanning electron microscopy. *American Journal of Veterinary Research*, vol.55,pp. 1060–5.
- Ferreira, J. C., Canesin, H. S., Ignácio, F. S., Rocha, N. S., Pinto, C. R. & Meira, C. (2015). Effect of age and endometrial degenerative changes on uterine blood flow during early gestation in mares. *Theriogenology*, vol.84,pp. 1123–1130.
- Ferreira, J. C., Gastal, E. L. & Ginther, O. J. (2008). Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: Effect of the size of the cystic area and age. *Reproduction*, vol.135,pp. 541–550.
- Ferris, R. A., Bohn, A., & Mccue P. M. (2015). Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. *Equine Veterinary Education*, vol.27,pp. 316–322.
- Ferris, R. A., Frisbie, D. D. & McCue, P. M. (2014). Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology*, vol.82,pp. 36–42.
- Fiala, S. M., Pimentel, C. A., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M. & Mattos, R. C. (2007). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, vol.67,pp. 556–562.
- Fiala, S. M., Pimentel, C. A., Steiger, K., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M. & Mattos, R. C. (2002). Effect of skim milk and seminal plasma uterine infusions in mares. *Theriogenology*, vol.58,pp. 491–494.
- Fioratti, E., Villaverde, A., Greco, G., Melo, C., Papa, F. & Alvarenga, M. (2009). Correlation between fluid accumulation, neutrophils concentration and uterine cytology in post-breeding endometritis in mares. In *Proceedings of the 11th International Congress of WEVA*.
- Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I. & Bowden, R. A. (2003). Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol.96,pp.31–41.

- Gores-Lindholm, A. R., LeBlanc, M. M., Causey, R., Hitchborn, A., Fayrer-Hosken, R. A., Kruger, M., Vandenplas, M., Flores, P. & Ahlschwede, S. (2013). Relationships between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance. *Theriogenology*, vol.80, pp. 218–227.
- Güvenc, K., Reilas, T. & Katila, T. (2005). Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, vol.63, pp. 2504–2512.
- Hemberg, E., Lundeheim, N. & Einarsson, S. (2004). Reproductive performance of Thoroughbred mares in Sweden. *Reproduction in Domestic Animals*, vol.39, pp. 81–85.
- Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C. & Schoon, H. A. (2009a). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*, vol.71, pp. 264–274.
- Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B. & Schoon, H. A. (2009b). The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, vol.111, pp. 261–278.
- Hurtgen, J. P. (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology*, vol.66, pp. 560–566.
- Jones, D. (1995). Fluid distribution and cervical loss following intrauterine infusion in the mare. *Equine Practice*, vol.17, pp. 12–19.
- Kalpokas, I., Perdigón, F., Rivero, R., Talmon, M., Sartore, I. & Viñoles, C. (2010). Effect of a povidone-iodine intrauterine infusion on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol.52, pp. 66. Retrieved from <http://www.actavetscand.com/content/52/1/66>
- Katila, T. (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction*, vol.1, pp. 515–517.
- Katila, T. (1996). Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*, vol.42, pp. 197–204.
- Katila, T. (1997). Neutrophils in uterine fluid after insemination with fresh live spermatozoa or with killed spermatozoa. *Pferdeheilkunde*, vol.13, pp. 540.
- Katila, T. (2001). Sperm-uterine interactions: A review. *Animal Reproduction Science*, vol.68, pp. 267–272.
- Katila, T. (2005). Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. *Animal Reproduction Science*, vol.89, pp. 31–38.
- Katila, T., Sankari, S. & Mäkelä, O. (2000). Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, pp. 571–8.
- Kenney, R. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol.172, pp. 241–62.
- Kenney, R. & Doig, P. (1986). Equine endometrial biopsy. In *Current Therapy in Theriogenology* (pp. 723–729). Philadelphia: Saunders Company.

- Khan, F. A., Chenier, T. S., Murrant, C. L., Foster, R. A., Hewson, J. & Scholtz, E. L. (2017). Dose-dependent inhibition of uterine contractility by nitric oxide: A potential mechanism underlying persistent breeding-induced endometritis in the mare. *Theriogenology*, vol.90, pp. 59–64.
- Khan, F. A., Scholtz, E. L. & Chenier, T. S. (2015). The Nitric Oxide System in Equine Reproduction: Current Status and Future Directions. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.35, pp. 481–487.
- Knutti, B., Pycock, J. F., Weijden, G. C. & Küpfer, U. (2000). The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. *Equine Veterinary Education*, vol.12, pp. 267–270.
- Koning, H. & Liebich, H. (2009). *Anatomia dos animais domésticos*. (Artmed, Ed.) (4th ed.). São Paulo.
- Kotilainen, T., Huhtinen, M. & Katila, T. (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, vol.41, pp. 629–636.
- Kozdrowski, R., Sikora, M., Buczkowska, J., Nowak, M., Raś, A., & Dzieciol, M. (2015). Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. *Animal Reproduction Science*, vol.154, pp. 56–62.
- LeBlanc, M. (2003). Persistent mating induced endometritis in the mare: Pathogenesis, diagnosis and treatment. In B. A. Ball (Ed.), *Recent Advances in Equine Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service.
- LeBlanc, M., Asbury, A. & Lyle, S. (1989). Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. *American Journal of Veterinary Research*, vol.50, pp. 864–7.
- Leblanc, M. & Causey, R. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, vol.44, pp. 10–22.
- LeBlanc, M. M. (2008). When to refer an infertile mare to a theriogenologist. *Theriogenology*, vol.70, pp. 421–429.
- LeBlanc, M. M. (2010). Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reproduction in Domestic Animals*, vol.45, pp. 21–27.
- LeBlanc, M. M., Johnson, R. D., Calderwood-Mays, M. B. & Valderrama, C. (1995). Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biology of Reproduction*, vol.1, pp. 109–113.
- LeBlanc, M. M., Magsig, J. & Stromberg, A. J. (2007). Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, vol.68, pp. 403–412.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Tran, T., Mauragis, D. & Klapstein, E. (1994). Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Veterinary Journal*, vol.26, pp. 109–113.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C. & Mauragis, D. (1998). Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*, vol.50, pp. 49–54.
- LeBlanc, M. & McKinnon, A. (2011). Breeding the Problem Mare. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (2nd ed., pp. 2620–2639). WileyBlackwell.

- LeBlanc, M., Neuwirth, L., Mauragis, D., Klapstein, E. & Tran, T. (1994). Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, vol.26, pp. 279–82.
- Ley, W. B., Bowen, J. M., Sponenberg, D. P. & Lessard, P. N. (1989). Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: Effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology*, vol.32, pp. 263–276.
- Lindsey, A. C., Bruemmer, J. E. & Squires, E. L. (2001). Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science*, vol.68, pp. 279–289.
- Liu, I. (2011). The diagnosis, causes and treatment of persistent endometritis in the mare, vol.35, pp. 256–261.
- Liu, I., Esteller-Vico, A., Couto, S., Hirschbrunner, G. & Aly, S. (2008). Assessment of equine endometrial and myometrial vascular elastosis: relationship to biopsy grade, age and parity. In M. M. LeBlanc (Ed.), *The Chronically Infertile Mare* (pp. 11–12). Hilton Head Island, SC: The Havemeyer Foundation.
- Liu, I., Rakestraw, P., Coit, C., Harmon, F. & Snyder, J. (1997). An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. *Pferdeheilkunde*, vol.13, pp. 557.
- Lögters, T., Margraf, S., Altrichter, J., Cinatl, J., Mitzner, S., Windolf, J. & Scholz, M. (2009). The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Medical Microbiology and Immunology*, vol.198, pp. 211–219.
- Love, C. (2011). Endometrial biopsy. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (2nd ed., pp. 1929–1939). Willey-Blackwell.
- Lu, K. G. & Morrese, P. R. (2006). Reproductive Tract Infections in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, vol.22, pp. 519–552.
- Madsen, M. & Christensen, P. (1995). Bacterial flora of semen collected from Danish warmblood stallions by artificial vagina. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol.36, pp. 1–7.
- Maischberger, E., Irwin, J., Carrington, S. & Duggan, V. (2008). Equine post-breeding endometritis: A review. *Irish Veterinary Journal*, vol.61, pp. 163.
- Marey, M. A., Yousef, M. S., Kowsar, R., Hambruch, N., Shimizu, T., Pfarrer, C. & Miyamoto, A. (2016). Local immune system in oviduct physiology and pathophysiology: attack or tolerance? *Domestic Animal Endocrinology*, vol.56, pp. 204–211.
- Matthews, P. & Morris, L. (2007). Low-Dose Insemination Techniques. In *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 315–318).
- Matthijs, A., Engel, B. & Woelders, H. (2003). Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. *Reproduction*, vol.125, pp. 357–367.
- Melkus, E., Witte, T., Walter, I., Heuwieser, W. & Aurich, C. (2013). Investigations on the endometrial response to intrauterine administration of N-acetylcysteine in oestrous mares. *Reproduction in Domestic Animals*, vol.48, pp. 591–597.
- Metcalf, E. S. (2014). The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.34, pp. 128.

- Mitchell, G., Liu, I., Perryman, L., Stabenfeldt, G. & Hughes, J. (1982). Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium - a mucosal immune system. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol.32, pp. 161–168.
- Morel, M. (1999). *Equine artificial insemination*. wallingford, Oxon, UK: CABI.
- Morris, L. H. A., Tiplady, C. & Allen, W. R. (2003). Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Veterinary Journal*, vol.35, pp. 197–201.
- Morris, L. H. A. & Allen, W. R. (2002). Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Veterinary Journal*, vol.34, pp. 51–60.
- Nash, D. M., Sheldon, I. M., Herath, S. & Lane, E. A. (2010). Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Animal Reproduction Science*, vol.119, pp. 31–39.
- Nielsen, H. J. (2005). Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *New Library World*, vol.106, pp. 510–518.
- Nielsen, J. M., Troedsson, M. H., Pedersen, M. R., Bojesen, A. M., Lehn-Jensen, H. & Zent, W. W. (2010). Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium: Comparison of Results Obtained by Swabs and Biopsies. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.30, pp. 27–30.
- Nikolakopoulos, E. & Watson, E. D. (2000). Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares, vol.32, pp. 164–166.
- Overbeck, W., Witte, T. S. & Heuwieser, W. (2011). Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, vol.75, pp. 1311–1318.
- Paccamonti, D. L., Pycock, J. F., Taverne, M. A., Bevers, M., Weijden, G. C. Van Der, Gutjahr, S., Schams, D. & Blouin, D. (1999). PGFM response to exogenous oxytocin and determination of the half-life of oxytocin in nonpregnant mares. *Equine Veterinary Journal*, vol.31, pp. 285–288.
- Palm, F., Walter, I., Budik, S. & Aurich, C. (2006). Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response of the endometrium in oestrous mares. *Animal Reproduction Science*, vol.94, pp. 286–289.
- Palm, F., Walter, I., Budik, S., Kolodziejek, J., Nowotny, N. & Aurich, C. (2008). Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology*, vol.70, pp. 843–851.
- Parham, P. (2005). *The immune system* (2nd ed.). New York: Garland Science.
- Parrilla-Hernandez, S., Ponthier, J., Franck, T. Y., Serteyn, D. D. & Deleuze, S. C. (2014). High concentrations of myeloperoxidase in the equine uterus as an indicator of endometritis. *Theriogenology*, vol.81, pp. 936–940.
- Pasolini, M. P., Prete, C. Del, Fabbri, S. & Auletta, L. (2016). Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry—A Review. In *Genital Infections and Infertility* (pp. 285–328).
- Perkins, N. R. (1999). Equine Reproductive Pharmacology. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, vol.15, pp. 687–704.
- Petersen, M., Nielsen, J., Lehn-Jensen, H. & Bojesen, A. (2009). Streptococcus equi subspecies zooepidemicus resides deep in the chronically infected endometrium of mares. *Clinical Theriogenology*, vol.1, pp. 393–409.

- Petersen, M. R., Skive, B., Christoffersen, M., Lu, K., Nielsen, J. M., Troedsson, M. H. T. & Bojesen, A. M. (2015). Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus in mares with subclinical endometritis. *Veterinary Microbiology*, vol.179, pp. 119–125.
- Pickett, B., & Amann, R. (1987). Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.7, pp. 289–302.
- Pickett, B., Squires, E., & McKinnon, A. O. (1987). Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Laboratory*, vol.3, pp.
- Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Rebordão, M. R., Amaral, A., Ramilo, D., Silva, E., ... Ferreira-Dias, G. (2017). Ovarian steroids, oxytocin, and tumor necrosis factor modulate equine oviduct function. *Domestic Animal Endocrinology*, vol.61, pp. 84–99.
- Platt, H., Atherton, J. G. & Orskov, I. (1976). *Klebsiella* and *Enterobacter* organisms isolated from horses. *J. Hyg.*, vol.77, pp. 401–8.
- Price, S., Aurich, J., Davies-Morel, M. & Aurich, C. (2008). Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15°C. *Reproduction in Domestic Animals*, vol.43, pp. 261–266.
- Pugliesi, G., de Carvalho, G. R., Rates, D. M., Ker, P. G., da Matta, M. P., de Oliveira, R. R. & da Silva Filho, J. M. (2012). Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol.41, pp. 2411–2417.
- Pycock, J. (2007a). Pregnancy Diagnosis in the Mare. In *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 335–342).
- Pycock, J. (2007b). Therapy for Mares with Uterine Fluid. In J. Samper, J. Pycock, & A. McKinnon (Eds.), *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 93–104). Saunders Elsevier.
- Pycock, J., & Allen, W. (1988). Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. *Veterinary Record*, vol.123, pp. 193–5.
- Pycock, J. F. (2006). How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare. *AAEP Proceedings*, vol.52, pp. 245–249.
- Pycock, J. F. (2009). Breeding Management of the Problem Mare. In J. C. Samper (Ed.), *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (pp. 139–164). St Louis, CA: Saunders Elsevier.
- Pycock, J. F. & Allen, W. E. (1990). Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Veterinary Journal*, vol.22, pp. 422–425.
- Pycock, J. & Newcombe, J. (1996). Assessment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. *Veterinary Record*, vol.138, pp. 320–3.
- Rambags, B. P. B., Colenbrander, B. & Stout, T. A. E. (2003). Early pregnancy loss in aged mares: probable causes and possible cures. *Pferdeheilkunde*.
- Rantala, M., Attia, S., Koukila-Kähkölä, P., De Hoog, S., Anttila, M. & Katila, T. (2015). *Cladophialophora bantiana* as an emerging pathogen in animals: Case report of equine endometritis and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.53, pp. 3047–3053.

- Rasmussen, C. D., Petersen, M. R., Bojesen, A. M., Pedersen, H. G., Lehn-Jensen, H. & Christoffersen, M. (2015). Equine Infectious Endometritis-Clinical and Subclinical Cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.35,pp. 95–104.
- Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., Galvão, A., Leitão, A., Vilela, C. & Ferreira-Dias, G. (2014). Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*, vol.106,pp. 41–49.
- Reghini, M. F. S., Bussiere, M. C. C., Neto, C. R., Resende, H. L., Fioratti, E., Farras, M. C. & Alvarenga, M. A. (2014). Effect of use of platelet rich plasma on post-breeding uterine inflammatory response of mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.34,pp. 127.
- Ricketts, S. W. & Alonso, S. (1991). The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Veterinary Journal*, vol.23,pp. 189–192.
- Ricketts, S. W. & Mackintosh, M. (1987). Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol.35,pp. 343–51.
- Riddle, W. T., LeBlanc, M. M. & Stromberg, A. J. (2007). Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, vol.68,pp. 395–402.
- Rigby, S., Barhoumi, R., Burghardt, R., Colleran, P., Thompson, J., Varner, D., Blanchard, T., Brinsko, S., Taylor, T., Wilkerson, MK. & Delp, M. (2001). Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biology of Reproduction*, vol.65,pp.740–7.
- Rowley, H. S., Squires, E. L. & Pickett, B. W. (1990). Effect of insemination volume on embryo recovery in mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.10,pp. 298–300.
- Samper, J. C. (1995). stallion semen cryopreservation: male factors affecting pregnancy rates. *Theriogenology*, ,pp. 160–165.
- Samper, J. C. (2009). Uterine edema in the mare. In J. C. Samper (Ed.), *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* (pp. 133–138). St Louis, CA: Saunders Elsevier.
- Samper, J., Estrada, A., & McKinnon, A. (2007). Insemination with Frozen Semen. In *Current Therapy in Equine Reproduction* (pp. 285–288).
- Schramme, A. R., Pinto, C. R. F., Davis, J., Whisnant, C. S. & Whitacre, M. D. (2008). Pharmacokinetics of carbetocin, a long-acting oxytocin analogue, following intravenous administration in horses. *Equine Veterinary Journal*, vol.40,pp. 658–661.
- Schroder, K., Hertzog, P., Ravasi, T. & Hume, D. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, vol.75,pp. 163–89.
- Schuberth, H. J., Taylor, U., Zerbe, H., Waberski, D. Hunter, R., & Rath, D. (2008). Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology*, vol.70,pp. 1174–1181.
- Scofield, D. B., Wittenburg, L. A., Ferris, R. A., Gustafson, D. L. & McCue, P. M. (2013). Equine Endometrial Tissue Concentration of Fluconazole Following Oral Administration. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.33,pp. 44–50.
- Sertich, P. L. (2007). Intrauterine diagnostic procedures. In J. Samper, J. Pycock, & A. McKinnon (Eds.), *Current therapy in equine reproduction* (pp. 36–43). Saunders Elsevier.

- Sieme, H., Bonk, A., Hamann, H., Klug, E. & Katila, T. (2004). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, vol.62, pp. 915–928.
- Sieme, H., Katila, T. & Klug, E. (2004). Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology*, vol.61, pp. 769–784.
- Sikora, M., Król, J.J., Nowak, M., Stefaniak, T., Aubertsson, G. & Kozdrowski, R. (2016). The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol.58, pp.1–10.
- Sinnemaa, L., Järvinen, T., Lehmonen, N., Mäkelä, O., Reilas, T., Sankari, S. & Katila, T. (2005). Effect of insemination volume on uterine contractions and inflammatory response and on elimination of semen in the mare uterus - Scintigraphic and ultrasonographic studies. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, vol.52, pp. 466–471.
- Sinowatz, F. (2012). Desenvolvimento do sistema urogenital. In P. Hyttel, F. Sinowatz, & M. Vejlsted (Eds.), *Embriologia veterinária* (1st ed., pp. 252–280). Rio de Janeiro: Saunders Elsevier.
- Snider, T. A., Sepoy, C. & Holyoak, G. R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, vol.75, pp. 1567–1581.
- Squires, E.L., Reger, H.P., Maclellan, L.J. & Bruemmer, J. E. (2002). Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. *Theriogenology*, vol.58, pp. 655–658.
- Taylor, U., Rath, D., Zerbe, H. & Schuberth, H. J. (2008). Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reproduction in Domestic Animals*, vol.43, pp. 166–175.
- Troedsson, M. (2006). Breeding-Induced Endometritis in Mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, vol.22, pp. 705–712.
- Troedsson, M. (2011). Endometritis. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (2nd ed., pp. 2608–2619). Wiley-Blackwell.
- Troedsson, M. H., Liu, I. K. & Thurmond, M. (1993). Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. *Biology of Reproduction*, vol.49, pp. 507–514.
- Troedsson, M. H. T. (1997). Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*, vol.13, pp. 516–520.
- Troedsson, M. H. T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, vol.52, pp. 461–471.
- Troedsson, M. H. T. (2006). Interaction between spermatozoa and the mare's reproductive tract is mediated by biochemical, physical, and inflammatory mechanisms. *Pferdeheilkunde*, vol.22, pp. 160–164.
- Troedsson, M. H. T., Desvougues, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P.T., Macpherson, M.L., Pozor, M. & Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, vol.89, pp. 171–186.

- Troedsson, M. H. T., Desvouses, A. L., Hansen, P. J. & Buhi, W. C. (2006). Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, vol.94,pp. 60–61.
- Troedsson, M. H. T., Esteller-Vico, A., Scoggin, K. E., Woodward, E. M., Squires, E. L., Ball, B. A. & Maxwell, H. (2014). Equine seminal plasma derived lactoferrin regulates binding of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.34,pp. 49.
- Troedsson, M. H. T., Liu, K. M., Ing, M., Pascoe, J. & Thurmond, M. (1993). Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection.
- Troedsson, M. H. T., Loset, K., Alghamdi, A. M., Dahms, B. & Crabo, B. G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, vol.68,pp. 273–278.
- Troedsson, M. H. T. & Woodward, E. M. (2016). Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reproductive Biology*, vol.16,pp. 8–12.
- Troedsson, M. & Liu, I. (1991). Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol.44,pp. 283–288.
- Troedsson, M., Liu, I. & Thurmond, M. (1993). Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. *Biology of Reproduction*, vol.49,pp. 502–6.
- Troedsson, M., Steiger, B., Ibrahim, N., Foster, D. & Crabo, B. (1995). Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. *Biology of Reproduction*, vol.52,pp. 307.
- Tuppits, U., Orro, T., Einarsson, S., Kask, K. & Kavak, A. (2014). Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. *Animal Reproduction Science*, vol.146,pp. 182–186.
- Vanroose, G., Kruif, A DE & Soom, A VAN. (2000). Embryonic mortality and embryo – pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, ,pp. 131–143.
- Vieira, M. J., Hott, A. K., Malschitzky, E., Keller, A., Wald, V. B., Mattos, A. L. G., Gregory, R. M. & Mattos, R. C. (2002). Antimicrobial agents in extender and their effect on semen preservation and pregnancy rate of inseminated mares. *Theriogenology*, vol.58,pp. 667–670.
- Waelchli, R. O. & Winder, N. C. (1991). Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: immunohistochemical studies. *Equine Veterinary Journal*, vol.23,pp. 470–474.
- Waelchli, R. & Winder, N. (1987). Immunohistochemical Evaluation of the Equine Endometrium During the Oestrous Cycle. *Equine Veterinary Journal*, vol.19,pp. 299–302.
- Walter, J., Neuberg, K. P., Failing, K. & Wehrend, A. (2012). Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Animal Reproduction Science*, vol.132,pp. 178–186.
- Watson, E. D. (2000). Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science*, vol.60–61,pp. 221–232.

- Watson, E. D., Barbacini, S., Berrocal, B., Sheerin, O., Marchi, V., Zavaglia, G., & Necchi, D. (2001). Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. *Theriogenology*, vol.56,pp. 123–131.
- Watson, E. D., Stokes, C. R. & Bourne, F. J. (1987). Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol.16,pp. 107–121.
- Watson, E., Stokes, C. & Bourne, F. (1987). Influence of arachidonic acid metabolites in vitro and in uterine washings on migration of equine neutrophils under agarose. *Research in Veterinary Science*, vol.43,pp. 203–7.
- Widders, P., CR, S., David, J. & Bourne, F. (1985). Specific antibodies in the equine genital tract following systemic and local immunization. *Immunology*, vol.54,pp. 763–769.
- Widders, P., Stokes, C., David J., & Bourne, F. (1984). Quantification of the immunoglobulins in reproductive tract secretion in the mare. *Research in Veterinary Science*, vol.37,pp. 324–330.
- Williamson, P., Dunning, A., O'Connor, J. & Penhale, W. J. (1983). Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis. *Theriogenology*, vol.19,pp. 441–448.
- Williamson, P., Munyua, S., Martin, R. & Penhale, W. (1987). Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol.35,pp. 317–25.
- Wolf, C. A., Maslchitzky, E., Gregory, R. M., Jobim, M. I. M. & Mattos, R. C. (2012). Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. *Theriogenology*, vol.77,pp. 1351–1359.
- Woodward, E., Christoffersen, M., Campos, J., Horohov, D., Scoggin, K., Squires, E. & Troedsson, M. (2013). An investigation of uterine nitric oxide production in mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effects of immunomodulation. *Reproduction in Domestic Animals*, vol.48,pp. 554–561.
- Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., Squires, E. L. & Troedsson, M. H. T. (2013). Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction*, vol.145,pp. 289–296.
- Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Squires, E. L. & Troedsson, M. H. T. (2012). Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*, vol.78,pp. 495–501.
- Woodward, E. M. & Troedsson, M. H. (2013). Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, vol.33,pp. 673–682.
- Wooley, R. E. & Jones, M. S. (1983). Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. *Veterinary Microbiology*, vol.8,pp. 271–280.